UNTERSUCHUNGEN VON hnRNS-PROTEIN-KOMPLEXEN VON DROSOPHILA MELANOGASTER MIT HILFE MONOKLONALER ANTIKÖRPER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

WERNER RISAU

aus Rheine

1983

UNTERSUCHUNGEN VON hnRNS-PROTEIN-KOMPLEXEN VON DROSOPHILA MELANOGASTER MIT HILFE MONOKLONALER ANTIKÖRPER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

WERNER RISAU

aus Rheine

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	18. Februar 1983
Dekan	Prof. Dr. K.-P. Hadeler
1. Berichterstatter	Prof. Dr. P. Hausen
2. Berichterstatter	Prof. Dr. D. Ammermann

Gesamtherstellung: aku - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. F.Bonhoeffer am Max-Planck-Institut für Virusforschung durchgeführt.

Dr. F. Bonhoeffer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hilfreichen Diskussionen. Peter Symmons und den anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, Dr. Harald Saumweber, Manfred Frasch, Rudolf Burberg, Raymond Dequin und Bernd Stolze, bin ich dankbar für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit.

Prof. P. Hausen, Dr. C. Pelling, Dr. H. Biessmann, Dr. L. Gierer und Dr. R. Stick möchte ich für Kritik und anregende Diskussionen danken. Siegfried Kobus danke ich für die Geschenke der Drosophila Ribosomen- und HeLa-RNP-Proteine sowie für hilfreiche praktische Ratschläge. Dr. E.Fyrberg, Dr. V. Corces, Dr. E. Craig und Raymond Dequin danke ich für die rekombinanten Plasmide und Dr. C. Dreyer für Antikörper.

Christel Schröpfer möchte ich danken für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung bei der Isolierung und Analyse von RNS und DNS und der rekombinanten Plasmide, Peter Symmons und Angelika Lanzendörfer für die Bereitstellung gereinigter monoklonaler Antikörper, Monika Wild für Zellkulturarbeit, Gudrun Thoma für die Anfertigung der Immunfluoreszenzbilder, Klara Ralinofsky für die Einsatzbereitschaft bei der Reinschrift dieser Arbeit und Gunilla Weinraub für die Anfertigung der Zeichnungen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

EINLEITUNG 1

ERGEBNISSE 15

I. Isolierung von hnRNP-Strukturen aus Drosophila Kc-Zellen 15

1. Optimierung 15

2. Charakterisierung der hnRNP-Strukturen 18

a) Verteilung von Makromolekülen 18

b) Größe der hnRNP-Strukturen 19

c) Größe der hnRNS 20

II. Monoklonale Antikörper gegen hnRNP-assoziierte Proteine 22

1. Anreicherung von Antigenen im hnRNP-Extrakt 22

2. Verteilung in Sucrosegradienten 26

3. Studien zur RNase- und DNase-Sensitivität der antigenenthaltenden Partikel 31

a) RNase-Sensivität 31

b) DNase I-Sensitivität 34

4. "Reverse RIA" 39

III. Einteilung der hnRNP-Proteine in Verpackungs- und Nichtverpackungsproteine 42

1. Identifizierung der Verpackungsproteine der hnRNS 42

a) Eindimensionale Gelelektrophorese 42

b) In vivo Vernetzung von RNS und Protein 46

c) Zweidimensionale Gelelektrophorese 48

Seite

2. Evidenzen für die Rolle der Antigene beim Processing der hnRNS 50

a) Qualitative Aspekte 50

b) Quantifizierung der Antigenmenge 51

c) Ionische Protein-RNS-Wechselwirkungen in hnRNP-Strukturen 59

IV. Heterogenität von hnRNP-Strukturen 62

1. Variabilität der Verteilung der Antigene in Sucrosegradienten 62

a) Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen 64

b) Hitzeschock 67

2. Direkte und indirekte Immunfluoreszenz auf polytänen Chromosomen 70

3. Verteilung der Antigene im Zellkern 73

V. Isolierung von RNS-Proteinkomplexen durch Affinitätsmatrices 74

1. Optimierung 74

a) Bindung von monoklonalen Antikörpern an verschiedene Affinitätsmatrices 75

b) Bindung von Antigenen an Antikörper-Affinitätsmatrices 78

c) Spezifität der Methode 80

2. Protein-Protein-Wechselwirkung in hnRNP-Komplexen 82

3. Protein-hnRNS-Wechselwirkung in hnRNP-Komplexen 84

4. Protein-snRNS-Wechselwirkung in hnRNP-Komplexen 88

DISKUSSION 93

I. Protein-RNS-Wechselwirkung in hnRNP-Komplexen 93

II. Assoziation von Antigenen mit hnRNP-Komplexen 97

III. Quantifizierung der Antigenmenge 102

Seite

IV. Mögliche Funktion der Antigene 104

V. Modellvostellungen von Protein-RNS-Wechselwirkungen beim Processing 110

ABKÜRZUNGEN 114

MATERIAL UND METHODEN 115

I. Isolierung und Analyse von subnukleären Partikeln und Kernproteinen von Drosophila Kc-Zellen 115

1. Zellkultur und in vivo Markierung von Drosophila Kc-Zellen 115

2. Präparation der Kerne und des hnRNP-Extraktes 116

3. Gelelektrophorese und Western Blot 117

4. In vivo Vernetzung von RNS und Protein 119

II. Isolierung und Analyse von RNS und DNS 120

III. Immunologische Methoden 122

1. Allgemeine Methoden 122

2. RIA und Reverse RIA 122

3. Immunpräzipitation 124

ZUSAMMENFASSUNG 125

LITERATURVERZEICHNIS 126

LEBENSLAUF 137

EINLEITUNG

Die Expression genetischer Information in eukaryotischen Zellen und ihre kontrollierte Änderung im Laufe der Entwicklung und Differenzierung ist von grundlegender Bedeutung für die Bildung und Funktion von Zellen und Organismen. Während Prokaryonten sich der Regulation der Transkription bestimmter Gene als einzigem Werkzeug zur Kontrolle der Genaktivität zu bedienen scheinen, sind bei Eukaryonten in neuerer Zeit verschiedene Ebenen der Regulation entdeckt und untersucht worden. Hauptkontrollpunkt bleibt aber auch bei Eukaryonten die Regulation der Transkription selbst, die jedoch eine weitaus größere Komplexität (z.B. hormonelle Kontrolle) zu besitzen scheint als in Prokaryonten und heute noch weitgehend unverstanden ist (Überblick bei Brown, 1981).

Das Genom eines Menschen hat rein rechnerisch eine 600fach größere Codierungskapazität als das des Bakteriums E.coli und die Eukaryontenzelle hat für diese Masse an DNS ein eigenes Kompartiment, den Kern, errichtet. Eine Folge ist, daß eine messenger RNS (mRNS) nach der vollständigen Transkription aus dem Kern zu den cytoplasmatischen Ribosomen transportiert werden muß. Dies setzt eine höhere Lebensdauer einer mRNS voraus und gibt zum anderen die Möglichkeit zu neuen zusätzlichen Kontrollmechanismen (Überblick bei Darnell, 1982). Im folgenden soll nicht auf die Regulation der Transkription, auf die Transkription und Kontrolle der ribosomalen-, 5S- und Transfer-RNS-Gene durch die verschiedenen RNS-polymerasen (I, III bzw. A, C) und

auch nicht auf mögliche Translationskontrollen bei Eukaryonten eingegangen werden, sondern nur auf Vorgänge, die direkt nach der Transkriptionsinitiation bis zum Transport aus dem Kern von RNS-Polymerase II (oder B) transkribierten Genen, die für Proteine codieren, ablaufen oder ablaufen können. Diese Vorgänge werden unter dem Sammelbegriff "Processing" zusammengefaßt.

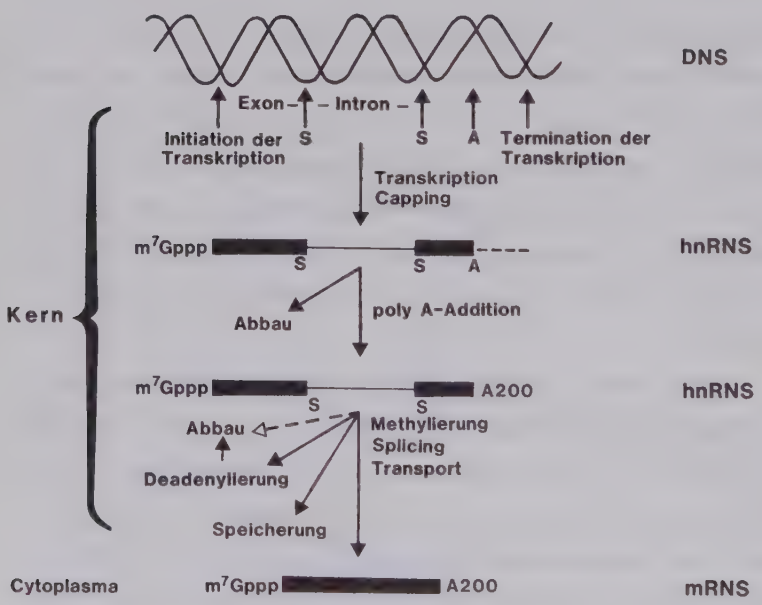


Abb. 1: Schritte des Processing eukaryotischer hnRNS

Die proteincodierende RNS liegt im Kern als sogenannte heterogene nukleäre RNS (hnRNS) vor. Sie ist heterogen in Bezug auf ihre Größe (1-30 kb) und wird auch DNS-ähnliche RNS genannt, weil sie eine ähnliche Basenzusammensetzung wie

die DNS hat. Sie ist größer als mRNS, und man weiß inzwischen, daß sie die Vorläufer-RNS der mRNS ist, d.h. sie enthält Nukleotidsequenzen, aus denen die mRNS aufgebaut wird. Neben einer Verkürzung des primären Transkriptes gehören aber noch andere Prozesse zum "Processing", die in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind und auf die im folgenden kurz eingegangen werden soll.

Im ersten Schritt wird am 5`-Ende der RNS während der Transkription eine 7-Methylguanosingruppe gebildet, die über 3 Phosphatgruppen an das erste Nukleotid der RNS angehängt wird. Diesem sogenannten "Capping" unterliegen alle bisher bekannten von RNS-Polymerase II transkribierten Gene, und auch alle Transkripte erhalten diese "Cap-Struktur". Die nascente RNS wird dadurch wahrscheinlich vor hydrolytischem Abbau durch Ribonukleasen geschützt. Funktionell spielt dieses "Cap" wahrscheinlich erst im Cytoplasma bei der Bildung des Translations-Initiationskomplexes von mRNS an die ribosomale 40S-Untereinheit durch Basenpaarung mit ribosomaler RNS eine Rolle.

Die Erkenntnis, daß proteincodierende mRNS ein polyA-Segment am 3`-Ende besitzt, war wichtig für die affinitätschromatographische Abtrennung dieser Sequenzen ($polyA^+$) von ribosomaler RNS und 5S- sowie Transfer-RNS ($polyA^-$) mit Hilfe von oligo-dT-Zellulose. Ein Ausnahme bildet die für Histonproteine codierende RNS, die kein polyA besitzt. PolyA wird jedoch nicht automatisch an terminierte Transkripte sythetisiert, sondern die RNS-Polymerase transkribiert über die prädestinierte polyA-Additionsstelle hinaus (s. Abb.1). Deshalb schließt der Vorgang der Polyadenylierung die Erken-

nung der RNS, der Anhängungsstelle für polyA (A in Abb.1; wahrscheinliche Erkennungssequenz: AAUAAA 10-25 Basen vor dieser Stelle) und die endonukleolytische Spaltung der RNS an dieser Stelle ein.

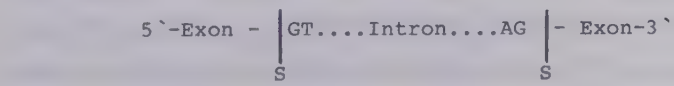
Überraschenderweise erhalten nicht alle Transkripte eines bestimmten Gens ein polyA-Segment, sondern man hat abgeschätzt, daß im Durchschnitt nur ungefähr 25 % polyadenyliert werden (Salditt-Georgieff and Darnell, 1982). Da nicht polyadenylierte hnRNS eine hohe Umsatzrate im Kern hat (Salditt-Georgieff et al., 1981; mit Ausnahme von Histongentranskripten) könnte einer Änderung der Polyadenylierungsfrequenz einer nascenten RNS regulatorische Bedeutung hinsichtlich der Menge einer bestimmten im Cytoplasma erscheinenden RNS zukommen.

Polyadenylierte hnRNS kann jedoch auch deadenyliert werden entweder im Cytoplasma (Brawerman, 1981) oder im Laufe des Transports zum Cytoplasma, wo sie dann als instabile polyA$^-$ RNS vorliegt (Zimmerman et al., 1982). Obwohl Histongentranskripte, wie bereits bemerkt, nicht polyadenyliert werden, sind sie dennoch nicht instabil. Es scheint, als ob diese Klasse von Transkripten (zu der vielleicht noch andere gehören), die streng entwicklungs- und zellzyklusabhängig exprimiert, translatiert und degradiert werden (Perry and Kelley, 1973; Anderson and Lengyel, 1980) einer anderen wahrscheinlich nicht kerngebundenen Kontrollinstanz unterliegen.

Seit der spektakulären Entdeckung im Jahre 1977, daß eukaryotische Gene nicht kolinear sind zu der von ihnen transkribierten mRNS, sondern aufgespalten sind in protein-

codierende (Exon) und nicht codierende (Intron) Teile, wurden in diese Genstruktur zahlreiche Regulationsmechanismen impliziert sowohl die Genexpression als auch die Genevolution betreffend (Übersicht z.B. bei Crick, 1978; Chambon, 1981; Darnell, 1982). Auf die die Genevolution betreffenden Fragen (sogenanntes Exonshuffling: Gilbert, 1978) soll hier nicht weiter eingegangen werden. Was die Genexpression gespaltener Gene betrifft, so weiß man, daß Introns transkribiert werden. Diese Sequenzen findet man also in der hnRNS vor, und ein Begriff aus der Seemannssprache wurde zu Hilfe genommen, den Vorgang des Herausschneidens dieser nicht proteincodierenden Sequenzen aus der hnRNS und des nachfolgenden Aneinanderfügens der proteincodierenden Teile einen Namen zu geben: Splicing (oder spleißen: Aneinanderknoten zweier Seilenden). Dieses Splicing erfordert große Präzision. Ein Nucleotid zuviel herausgeschnitten bedeutet eine Verschiebung des genetischen Codes und die Expression - falls überhaupt (s. unten) - eines total anderen Proteins.

In niederen Eukaryonten (z.B. Schleimpilz, Hefe) scheinen weit weniger und kürzere Introns vorzukommen als in höheren. Das Gen für Prokollagen des Hühnchens soll z.B. ungefähr 50 Introns enthalten und die hnRNS fünf- bis siebenmal länger sein als die mRNS (Vogeli et al., 1980). Da man eine übereinstimmende Nucleotidsequenz (Consensus-Sequenz) an den Intron-Exon-Grenzen von vielen eukaryontischen Genen gefunden hat, hält man Splicing für einen konservativen Prozeß (Sharp, 1981). Diese Sequenz



(s.Abb.1) gilt jedoch wiederum nur für proteincodierende Gene. Ribosomale und Transfer-RNS-Gene haben - auch bei Bakterien - zwar Introns, aber weder diese Consensus-Sequenz noch den gleichen enzymatischen Splicing-Apparat wie Polymerase II-transkribierte Gene (Abelson, 1979; Cech, 1981).

Neuere Methoden der rekombinanten DNS-Technologie haben es ermöglicht, Aussagen über Spezifität, Bedingungen und Konsequenzen des Splicing-Prozesses zu machen. Chu und Sharp (1981) konnten z.B. zeigen, daß ein chimäres Gen, bestehend aus Exons vom SV40-Virus und Maus-ß-Globingen in Affenzellen transkribiert und richtig geschnitten und zusammengefügt wird. Die Verträglichkeit zwischen Exons (und Exon-Intron-Grenzen) verschiedener Spezies ist dadurch nachgewiesen und hat wahrscheinlich große Bedeutung bei der Aufnahme zellulärer Gene durch Retroviren, die transformierende Eigenschaften haben (Sharp, 1981).

Aufklärung auf molekularer Ebene erfuhren auch zahlreiche Expressionsveränderungen von ß-Globin-Genen. Die $ß^{+}$- und $ß^{o}$-Thalassämien sind Krankheiten, die durch die reduzierte bzw. völlig gehemmte Biosynthese der ß-Globin-Proteinuntereinheit des Hämoglobins A ($\alpha_2 ß_2$) charakterisiert sind. Verändertes Splicing ist in zwei besonders spektakulären Fällen die Folge einer Mutation und der Grund für den Defekt. Im ersten Fall einer $ß^{o}$-Thalassämie (Treisman et al., 1982) wird eine normale Consensus-5`-Splice-Sequenz inaktiviert und ein neues, innerhalb des Introns gelegenes Splice-Signal benutzt. Die resultierende RNS ist um 47 Nukleotide länger, in denen ein Translations-Stop-Codon enthalten ist. Im zweiten Fall einer $ß^{+}$-Thalassämie (Fukumaki et al., 1982) wird

durch eine Mutation ein neues Splice-Signal innerhalb eines Introns erzeugt. Die resultierende hnRNS ist diesmal um 19 Nukleotide länger, die ebenfalls ein Translations-Stop-Codon enthalten. Diese RNS wird aber gar nicht ins Cytoplasma transportiert, sondern akkumuliert im Kern. Nur der kleine Teil der hnRNS, der an der richtigen Splice-Stelle geschnitten wurde, bildet eine stabile, translatierbare mRNS.

Unter vielen Pseudogenen (nicht exprimierte Gene) im eukaryontischen Genom findet man auch solche, die eine genaue Kopie der mRNS eines ansonsten mit Introns vorliegenden Gens sind. Abgesehen von ihrer möglichen Entstehung (s. Science, 216, S. 969) ist interessant, daß intronlose Gene scheinbar keine stabile hnRNS bilden können und somit Splicing ein obligatorischer Schritt der Bildung einer stabilen mRNS sein könnte (Hamer and Leder, 1979). Intronlose Gene (Interferongene, Hitzeschock- und Copiagene von Drosophila, das Herpes simplex Thymidinkinase-Gen und Histongene z.B.) müßten dann völlig anders reguliert werden.

Mit der Entdeckung "gestückelter" Gene und des splicing wurde postuliert, daß eine solch komplexe Genstruktur und ein derartig aufwendiger, hochspezifischer Prozeß eine Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen müsse. Obwohl man zunächst eukaryontische DNS-Viren (z.B. SV40, Adeno) wegen ihres begrenzten DNS-Gehaltes für Sonderfälle in bezug auf ihre posttranskriptionelle Kontrolle gehalten hatte, liefern gerade die bei diesen Viren ablaufenden Prozesse (Überblick bei Ziff, 1980; Nevins and Wilson, 1981; Akusjärvi and Persson, 1981; Nevins, 1982) Musterbeispiele für die auch bei zellulären Genen ablaufende posttranskrip-

tionelle Kontrolle. Die Entscheidung über verschiedene mögliche Polyadenylierungsstellen und differentielles Splicing (Aussuchen von Exons) scheinen dabei in konzertierter Aktion zu wirken, und möglicherweise bestimmt die Stelle der Polyadenylierung (die dem Splicing vorausgeht: Nevins and Darnell, 1978), welche Exons zusammengesetzt werden. Beispiele sind das Umschalten eines Lymphozyten vom membrangebundenen zum sezernierten IgM (Entscheidung zwischen zwei verschiedenen polyA-Stellen: Wall, 1982), die gleichwertige Produktion von IgM und IgD von einer Transkriptionseinheit (polyA und Splicing: Maki et al., 1981), die gewebespezifische Expression eines für verschiedene Peptidhormone codierenden Gens (Amara et al., 1982) und die Expression unterschiedlicher Fibrinogenketten von einer Transkriptionseinheit (splicing: Crabtree and Kant, 1982).

Die Produktion verschiedener Polypeptide aus einer Transkriptionseinheit dürfte jedoch nicht die einzige Aufgabe des Splicing und der einzige Sinn (neben dem Evolutions-Gesichtspunkt) der Exon-Intron-Struktur eukaryontischer Gene sein. Denn sowohl die Stabilität von Transkripten (siehe oben) als auch die Transportfähigkeit aus dem Kern scheint an ein korrektes Splicing gebunden zu sein (Therwath and Scherrer, 1978; Gruss et al., 1979; Fukumaki et al., 1982; Imaizumi-Scherrer et al., 1982).

Eine dieser weiteren Kontrollmöglichkeiten beim Processing, nämlich die Entscheidung zwischen Abbau und Transport (bzw. Splicing oder Polyadenylierung) wird auch bei intronlosen Genen gefunden. Nur 7 % z.B. der Gesamtmenge von Copia-Transkripten in Drosophila erscheinen im Cytoplasma

(Falkenthal et al., 1982), und es gibt generell unterschiedliche Umsatzraten für hnRNS-Populationen im Zellkern (siehe z.B. Levis und Penman, 1977). Auch das Verweilen bestimmter hormonregulierter Transkripte im Zellkern über eine längere Zeit (Speicherung, s. Abb.1) wurde beobachtet (Bonner and Pardue, 1977).

Mit Ausnahme der direkten Rückkopplung eines Intron-codierten Splicing-Enzyms im mitochondrialen Cytochrom b-Gen der Hefe (Lazowska et al., 1981) und des anscheinend proteinunabhängigen Splicing eines ribosomalen Introns in Tetrahymena (Kruger et al., 1982) sind neben den Cap- und polyA-synthetisierenden und splicing Enzymen Faktoren notwendig, die bestimmen, welche polyA-Stelle benutzt wird, ob überhaupt polyadenyliert wird, welche Splice-Stelle benutzt wird und ob die richtige benutzt wurde usw. Beteiligt an einer Regulation beim Processing sind wahrscheinlich solche Proteine, die mit der hnRNS wechselwirken. Man weiß aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen, daß nascierende RNS noch während der Transkription mit Proteinen komplexiert wird (Miller and Hamkalo, 1972). Im Gegensatz zu prokaryotischer und Transfer-RNS, die nicht komplexiert werden, und ribosomaler RNS, die mit ribosomalen Proteinen schon im Nukleolus bestückt wird, wird eukaryotische hnRNS durch distinkte Proteine verpackt. Diese heterogene nukleäre RNS enthaltenden Ribonucleoproteinpartikel (hnRNP) sind aus verschiedenen Spezies isoliert und biochemisch untersucht worden. Zwei Methoden wurden zu diesem Zweck vorwiegend benutzt, einmal die Extraktion sogenannter monomerer oder Core-Partikel (Größe ca. 30-40S) aus gereinigten Kernen

durch längere Inkubation bei höherer Temperatur und höherem pH-Wert, zum anderen die Ultraschallbehandlung von gereinigten Kernen, die die Isolierung großer hnRNP-Strukturen (Größe ca. 80-200S) erlaubt (Übersicht über die Methoden bei van Venrooij and Janssen, 1978).

Ähnlich den DNS-enthaltenden Nucleosomen bestehen große hnRNP-Strukturen aus den core-Partikeln als Untereinheiten. Die Proteine, die diese Partikel aufbauen, werden Verpackungs- oder Core-Proteine genannt. Sie sind mit Hilfe beider Methoden hauptsächlich aus Vertebraten (z.B. HeLa- und Rattenleberzellen) isoliert und charakterisiert worden (Samarina et al., 1968; Martin et al., 1973; Pederson, 1974; Beyer et al., 1977; Karn et al., 1977). In der Gruppe der Nichthistonproteine stellen sie eine Gruppe von Proteinen dar, die in höherer Kopienzahl vorkommen, sehr basisch sind, eine geringe Umsatzrate haben (Martin et al., 1979) und konserviert sind unter Vertebraten.

Da diese Proteine nur im Zellkern vorkommen (Lukanidin et al., 1972a und b, Jones et al., 1980) muß es einen großen strukturellen Umbau an der Kernmembran oder den Kernporen geben, denn die mRNS liegt im Cytoplasma wiederum als Protein-RNS-Komplex (mRNP) vor, an dem jedoch andere Proteine beteiligt sind (s. z.B., Kumar and Pederson, 1975). Trotz dieses Umbaus gibt es keine freien RNS-bindenden Moleküle im Zellkern (Pederson, 1974). Es ist noch nicht geklärt, ob die Core-Proteine eine regulatorische Funktion besitzen, sie kommen jedoch an allen bisher getesteten nichtribosomalen Transkriptionseinheiten vor, und man findet alle Arten von mRNS-Sequenzen in den von ihnen aufgebauten Partikeln (Kin-

niburgh and Martin, 1976).

Eine große Anzahl weiterer Proteine findet man besonders bei der Isolierung großer hnRNP-Strukturen (Übersicht bei van Venrooij and Janssen, 1978). Sie kommen in geringerer Häufigkeit vor als die Core-Proteine und wären mögliche Kandidaten für posttranskripionelle Regulationsvorgänge, wenn ausgeschlossen werden kann, daß sie Kontaminationen z.B. vom Cytoplasma oder Chromatin darstellen. Viele dieser Proteine sind ionisch nur schwach mit hnRNP-Strukturen verbunden (Gallinaro-Matringe et al., 1975), deshalb müssen zum Nachweis der Spezifität der Wechselwirkung andere Eigenschaften ausgenutzt werden als die bloße Kosedimentation in Sucrosegradienten. Durch UV-Vernetzung von Protein an RNS z.B. hat man polyA-bindende Proteine eindeutig identifizieren können (Setyono and Greenberg, 1981).

Andere Funktionen (z.B. enzymatische Aktivitäten) sind nur fragmentarisch bekannt oder kontrovers (Knowler and Wilks, 1980).

Neben der Transfer-, 5S- und 5,8S-RNS gibt es noch eine weitere Art stabiler kleiner RNS im Zellkern (und auch im Cytoplasma) von Eukaryonten (Überblick bei Busch et al., 1982). Diese snRNS besteht aus ungefähr zehn diskreten Spezies (genannt U1-Ux), die 100-300 Nukleotide lang sind und von denen ein Teil von Polymerase II (mit Cap-Struktur), der andere von Polymerase III transkribiert wird (Zieve, 1981). Diese RNS ist nicht proteincodierend, sondern verbleibt im Kern als Protein-RNS-Komplex (snRNP). Aufsehen erregten diese snRNPs als gezeigt wurde, daß sich in Seren von autoimmunkranken Patienten (z.B. Lupus erythrematosus) Anti-

körper fanden, die gegen diese snRNPs gerichtet waren (Lerner and Steitz, 1979, 1981). Mit Hilfe dieser Antikörper und RNS-Sequenzierungstechniken konnte nachgewiesen werden, daß eine U1-RNS komplementäre Sequenzen zu den Splice-Consensus-Sequenzen eukaryontischer Gene enthält. Ein Modell wurde entworfen, in dem das U1-RNP-Partikel durch Basenpaarung mit hnRNP an beiden Exon-Intron-Grenzen für die Spezifität des Splicing verantwortlich ist (Rogers und Wall, 1980; Lerner et al., 1980). Tatsächlich wurden snRNPs auch in hnRNP-Strukturen gefunden (Lerner et al., 1980; Zieve and Penman, 1981) und Basenpaarung mit der hnRNS nachgewiesen (Calvet und Pederson, 1981).

Zahlreiche Unstimmigkeiten haben aber in letzter Zeit zu der Auffassung geführt, daß diese snRNPs eher am Transport der hnRNP-Strukturen beteiligt sind (Spector et al., 1982) - ähnlich wie das "Signal-Recognition-Particle" des Cytoplasmas, das eine 7S-RNS als essentielle Komponente enthält (Walter and Blobel, 1982) - als am Splicing selbst. Ein *in vitro* Splicing bzw. Transportsystem wäre vonnöten, um diese Frage zu klären.

Die dreidimensionale Struktur und Art der Verpackung an besonderen Sequenzen der RNS werden für immer wichtiger gehalten für die Spezifität der Prozesse, die an der hnRNS angreifen (s. Science 216, 1208; Khoury et al., 1979). Tatsächlich ließ sich in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß die RNP-Struktur sequenzabhängig und nicht zufällig ist (Beyer et al., 1980) und daß Schnittstellen nascierender RNS am Chromatin an besonderen Partikelstrukturen vorkommen (Beyer et al., 1981).

In unserer Arbeitsgruppe wurde und wird versucht, mit Hilfe monoklonaler Antikörper (Köhler und Milstein, 1975) gegen Kernproteine Aufschlüsse über Verteilung, Eigenschaften und funktionelle Struktur von bestimmten regulatorisch wirkenden Polypeptiden und Protein-Nukleinsäure-Komplexen zu gewinnen. Drosophila wurde als Organismus gewählt wegen des hervorragenden genetischen Hintergrundes, der geringen Genomkomplexität ($2x10^{11}$D) und des Vorkommens von polytänen Chromosomen in den Speicheldrüsen der Larven. Dicht gepacktes (Banden) und aufgelockertes (Interbanden) Chromatin und die Orte genetischer bzw. transkriptioneller Aktivät (Puffs) lassen sich lichtmikroskopisch auf diesen polytänen Chromosomen unterscheiden. Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz ermöglicht es, die Verteilung von Antigenen auf diesen Chromosomen zu ermitteln (Silver and Elgin, 1978).

Fraktionen von über Hydroxylapatit aufgetrennten Kernproteinen aus Drosophila-Zellkulturzellen wurden zur Immunisierung von Mäusen benutzt (Saumweber et al., 1980). Nach der Fusion der Milzzellen dieser Tiere mit Myelomzellen wurden Zellklone erhalten, die Antikörper gegen Kernhüllenantigene (Risau et al., 1981), ein Nukleolusantigen und chromosomale Proteine (Saumweber et al., 1980) sezernierten. Letztere wurden auf Grund ihrer Verteilung in drei Klassen eingeteilt (siehe Tabelle 2).

Meine Arbeit war es herauszufinden, welche Rolle die Proteine der Klasse 1, die in Puffs und einigen Interbanden vorkommen, im Zellkern von Drosophila spielen. Puffs sind transkriptionsaktive Stellen, und es war daher wahrscheinlich, daß einige der Antigene mit hnRNS assoziiert sein

könnten. Da die Isolierung von hnRNP-Strukturen aus Drosophila noch nicht gelungen war, mußte zunächst eine solche Methode entwickelt werden. Kombinierte immunologische, cytologische und biochemische Tests ergaben dann, daß mindestens 7 verschiedene Polypeptidantigene Bestandteile dieser hnRNP-Strukturen sind.

Nach Identifizierung der Core-Proteine von Drosophila-hnRNP wurde klar, daß die untersuchten Antigene nicht mit den Verpackungsproteinen der hnRNS identisch sind. Quantitative Untersuchungen unterstützten diesen Befund. Eine genaue Analyse der direkten quantitativen Immunfluoreszenz auf polytänen Chromosomen und die differentielle Verteilung der Antigene bezüglich der hnRNS und zueinander lassen den Schluß zu, daß die untersuchten hnRNP-Komplexe heterogen sind. Gemäß ihrer Verteilung im Sucrosegradienten wurde eine Einteilung der Antigene in 3 Gruppen vorgenommen. Da diese Antigene nur ungefähr ein- bis fünfmal pro Transkript vorkommen, nehmen sie vermutlich katalytische Funktionen beim Processing von hnRNS wahr.

ERGEBNISSE

I. Isolierung von hnRNP-Strukturen aus Drosophila-Kc-Zellen

1. Optimierung

Die Möglichkeit, genetische Aktivität lichtmikroskopisch auf polytänen Chromosomen zu erkennen und die Ergebnisse der Spreitungsversuche mit nachfolgender elektronenmikroskopischer Darstellung von hnRNP-Komplexen in Drosophila-Chromatin hat Versuche stimuliert, diese Komplexe biochemisch zu charakterisieren. Im Gegensatz zu Vertebratenzellen ließen sich jedoch aus Drosphilazellen bis vor kurzem keine derartigen Strukturen nach den bekannten (s.Einleitung) Methoden isolieren (Kobus 1979; Siegfried Kobus, persönliche Mitteilung; Thoru Pederson, persönliche Mitteilung; eigene Versuche). Ein Hauptgrund mag der hohe endogene Ribonukleasegehalt einiger Drosophilazellen sein (siehe z.B. Lengyel and Penman, 1975).

Thomas et al. (1981) veröffentlichten eine Methode zur Isolierung von chromatinassoziierten hnRNPs aus Hühnerzellen. Diese Methode wurde modifiziert, um Drosophila-hnRNPs zu isolieren. Nach Veränderung des Salzgehaltes der Puffer (wegen der Salzempfindlichkeit der Antigene, s. III2c), der Optimierung der Pulsmarkierung der RNS (s. Methoden) und Einführung des EDTA-Waschens (s. unten) ergab sich die Standardprozedur zur Isolierung von Drosophila-hnRNPs, die in Abb.2 schematisch dargestellt ist.

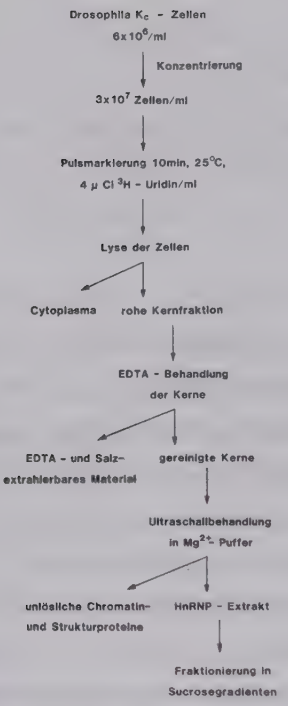


Abb. 2: Schematische Darstellung der Isolierung des hnRNP-Extraktes

Große, pulsmarkierte, nichtribosomale Kern-RNS wird definitionsgemäß als hnRNS bezeichnet. Die ribosomale RNS-Synthese wurde in den Experimenten, die in diesem Teil I beschrieben werden, durch Vorinkubation der konzentrierten Zellen mit 5-Fluorouridin gehemmt (Lengyel and Penman, 1975; Levis and Penman, 1977). Nukleoli bleiben außerdem während der hier angewendeten Ultraschallbehandlung weitgehend intakt (Pederson, 1974; Thomas et al., 1981; s.Abb.7,28 und Tabelle 2: Ajl-Antigen), so daß mit einer nur geringen Kontamination an ribosomaler Vorläufer-RNS bzw -RNP gerechnet werden muß.

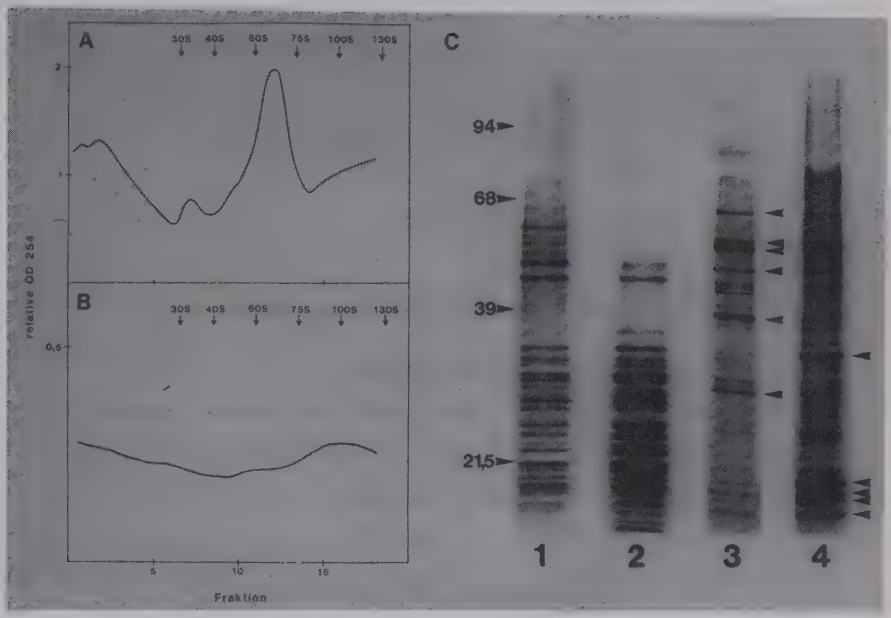


Abb. 3: Kernreinigung
Protein-RNS-Komplexe des EDTA-Wasches (A) und des hnRNP-Extraktes (B) wurden auf 10-45%igen Sucrosegradienten aufgetrennt und die optische Dichte (OD) bei 254 nm bei der Fraktionierung der Gradienten aufgezeichnet (ISCO-Gradientenfraktionator). Die Proteine des EDTA-Wasches (C, Bahn 1), von Drosophila-Ribosomen (Bahn 2; Geschenk von S.Kobus), des hnRNP-Extraktes (Bahn 3) und der unlöslichen Kernfraktion (Bahn 4) wurden auf 10-17%igen SDS-Polyacrylamidgelen nach Coomassie-Blau-Färbung analysiert. Die Mobilität von Markerproteinen ist durch Pfeile (Bahn 1) gekennzeichnet: 94 kD: Phosphorylase a; 68 kD: Rinderserumalbumin; 39 kD: RNS-Polymerase (E.coli, kleine Untereinheit); 21,5 kD: Trypsininhibitor.

Cytoplasmatische Ribosomenkontamination wurde durch EDTA-Behandlung der Kerne entfernt, wie in Abb.3 demonstriert. Eine Analyse des EDTA-Wasches in Sucrosegradienten zeigt deutlich die ribosomalen Untereinheiten (Abb.3A), die im hnRNP-Extrakt fehlen (Abb.3B). Das Proteinmuster des EDTA-Wasches (Abb.3C1) hat ebenfalls große Ähnlichkeit mit ribosomalen Proteinen (Abb.3C2), während die Proteinzusam-

mensetzung des hnRNP-Extraktes völlig anders ist (Abb.3C3). Der Vergleich mit der unlöslichen Kernfraktion (Abb.3C4), die hauptsächlich die Histone (Pfeile in Abb.3C4)enthält, belegt die Anreicherung einiger Polypeptide (Pfeile in Abb.3C3).

2. Charakterisierung der hnRNP-Strukturen

a) Verteilung von Makromolekülen

In Tabelle 1 ist die Verteilung von Makromolekülen im hnRNP-Extrakt und im Sediment des Sucrosegradienten aufgeführt. Die Werte für Protein, RNS und DNS wurden von Peter Symmons bestimmt und hier mit seiner Zustimmung abgedruckt. Sie stellen Mittelwerte von 3 Experimenten dar. Der Gehalt an pulsmarkierter RNS wurde aus 5 verschiedenen Experimenten gemittelt. Da die Hemmung der ribosomalen RNS-Synthese nicht vollständig mit 5-Fluorouridin gelingt (Levis and Penman, 1977), sind wahrscheinlich mehr als 73 % der hnRNS isoliert worden. In Übereinstimmung mit der Verteilung der Histonproteine (Abb.3) befinden sich nur 3,3% der Gesamt-DNS im Extrakt, wovon die Hauptmenge im Sediment des Gradienten zu finden ist. Man erreicht also eine hohe Anreicherung hnRNS-enthaltender Strukturen unter gleichzeitiger fast vollständiger Abtrennung vom Chromatin.

Tabelle 1 Verteilung von Makromolekülen im Drosophila hnRNP-Extrakt

	$1x10^9$ Kerne	hnRNP Extrakt	%	Sediment des Gradienten	% des Extraktes
Protein (mg)	11.7	1.63	14	0.28	17
RNS (mg)	1.08	0.34	31.5	0.09	26
Pulsmarkierte RNS (cpm)	$1.4x10^5$	$1.02x10^5$	73	$1x10^4$	9.6
DNS (mg)	0.9	0.03	3.3	0.02	67

b) Größe der hnRNP-Strukturen

Zwei verschiedene Zentrifugationsbedingungen von 10-45%igen Sucrosegradienten sind als Beispiele der Optimierung der Auftrennung von hnRNP-Komplexen gezeigt (Abb.4). Die Komplexe sind heterodispers verteilt. Der größte Teil der die pulsmarkierte RNS enthaltenden Komplexe hat eine Größe von 90-130S (4a). Nach längeren Zentrifugationszeiten liegen die Komplexe, die größer als ca. 150S sind (4b), als Sediment vor. Diese Bedingungen gewährleisten aber eine bessere Trennung der antigenenthaltenden Komplexe (s.II2) und wurden deshalb standardmäßig benutzt.

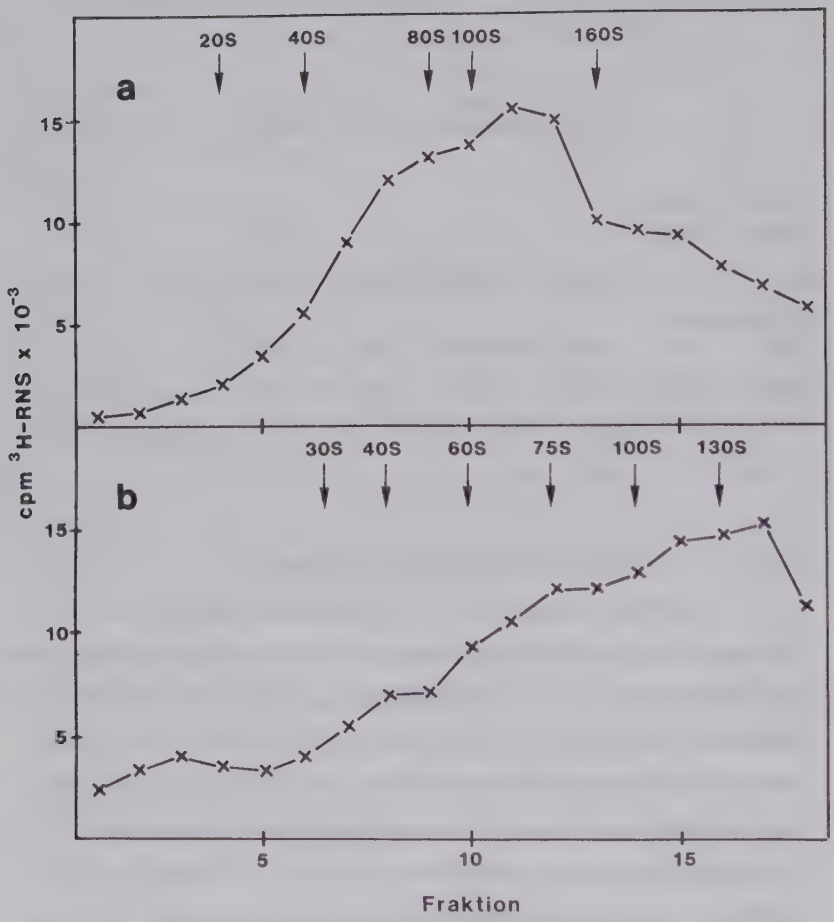


Abb. 4: Sedimentationsanalyse von hnRNP-Komplexen
Der hnRNP-Extrakt wurde auf 10-45%igen Sucrosegradienten im Sw41-Rotor aufgetrennt (a: 2 Std., 40.000 UpM; b: 14 Std., 20.000 UpM).

c) Größe der hnRNS

Gereinigte, pulsmarkierte, denaturierte RNS aus intakten Kernen hat bei Analyse auf SDS-Sucrosegradienten eine Größenverteilung von 15-30S (Abb.5, s.auch Lengyel and

Penman, 1975). Die aus dem hnRNP-Extrakt nach der Ultraschallbehandlung gereinigte RNS hat eine Größe von 15-25S (Abb.5). Nicht denaturierte RNS aus Kernen und Extrakt enthält mehr schneller sedimentierende RNS (nicht gezeigt).

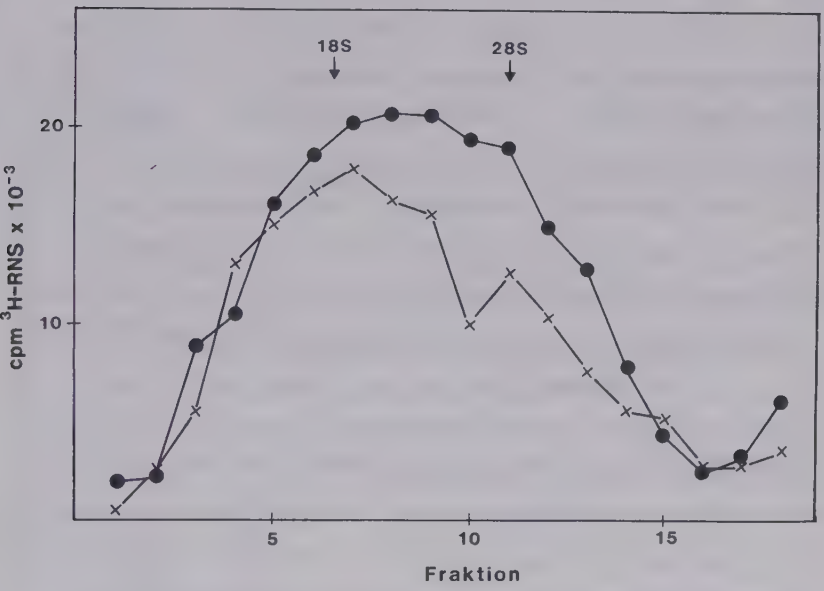


Abb. 5: Sedimentationsanalyse gereinigter RNS
Pulsmarkierte, gereinigte und denaturierte RNS aus intakten Kernen (●) und dem hnRNP-Extrakt (x) wurde auf 15-30%igen SDS-Sucrosegradienten (SW41-Rotor, 30.000 UpM, 7 Std.) analysiert. Radioaktiv markierte 18S- und 28S-ribosomale RNS aus HeLa-Zellen als Marker (BRL) wurde parallel analysiert.

II. Monoklonale Antikörper gegen hnRNP-assoziierte Proteine

1. Anreicherung von Antigenen im hnRNP-Extrakt

Zur ersten Auslese der Antikörper, die gegen hnRNP-assoziierte Proteine gerichtet sein könnten, wurde die Anreicherung von Antigenen im hnRNP-Extrakt mit Hilfe des Radioimmuntests (RIA) bestimmt (s.Methoden). Die Ergebnisse dieses Tests sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Darüber hinaus gibt diese Tabelle eine zusammenfassende Darstellung der bisher bekannten Eigenschaften der Antikörper und Antigene, die näher untersucht worden sind. Die Namen der Antikörper sind aus der Bezeichnung der Zellfusion und des entsprechenden Zellklons hervorgegangen (Saumweber et al., 1980). Einige Eigenschaften der mit einem * markierten Antikörper wurden bereits beschrieben (Saumweber et al., 1980; Risau et al., 1981; Saumweber 1980; Frasch, 1981). Der Y55-Antikörper wurde anstelle des früheren Vertreters der alle Interbanden - aber nicht Puffs - färbenden Antikörper Z4 eingesetzt, weil er deutlich positive Ergebnisse im Western-Blot und RIA ergab.

Die Immunglobulinklasse wurde nach Ouchterlony und Nilsson (1978) bestimmt. Die Färbemuster der indirekten und direkten Immunfluoreszenz wurden entweder an ganzen Speicheldrüsenzellen (s. auch Abb. 28) oder auf isolierten Chromosomen analysiert. Die Antikörper gegen chromosomale Proteine sind diesem Färbemuster entsprechend in drei Klassen eingeteilt worden (Saumweber et al., 1980). Puffs und Interbanden bedeutet, daß außer den meisten Puffs

Tabelle 2: Zusammenfassung der Eigenschaften der untersuchten Antikörper

Antikörper	Antikörper-Klasse	Färbeverhalten in der Immunfluoreszenz	Klasse	Molekulargewicht d. Antigens (D)	Isoelektr. Punkt des Antigens	Anreicherung im HnRNP-Extrakt (%)
X4	IgG1	Puffs u. Interbanden	1	100.000	6,0	70
*T7	"	" " "	1	90.000	7,8	71
*S5	"	" " "	1	70.000	5,5-6,0	77
*T29	"	" " "	1	70.000	5,5-6,0	74
Q18	IgG2a	" " "	1	55.000	6,7	69
*V4	IgG1	" " "	1	48.000	4,6	62
*P11	IgG2a	" " "	1	38.000	7,0-7,2	68
*Q16	IgG1	" " "	1	38.000	7,0-7,2	62
*P46	"	" " "	1	30.000	4,5	75
*P12	"	Banden	2	28.000	n.b.	19
Y55	"	Interbanden	3	190.000	n.b.	82
*T40	"	Kernhülle		80.000	n.b.	39
*Aj1	"	Nukleolus		47.000	4,3	20

selektiv einige Interbanden gefärbt werden. Das Muster ist verschieden von dem, was man mit Antikörpern gegen RNS-Polymerase II erhält (Krämer et al., 1980; Kabisch, 1982).

Das Molekulargewicht der Antigene wurde mit Hilfe des Protein-Blotting (oder auch Western Blot) bestimmt (Risau et al., 1981). Beispiele für Antikörper, die eine Polypeptidbande gleichen Molekulargewichts erkennen, sind in Abb.6A dargestellt. Alle Antikörper reagieren mit nur einer Polypeptidbande mit Ausnahme von T7, der unter den bisher getesteten Bedingungen immer zwei Polypeptide erkannte (90.000D Hauptbande und 85.000D).

Der isoelektrische Punkt (I.P.) des Antigens wurde durch ein neuartiges Blotting von Fokussierungsgelen ermittelt. Ähnlich dem "native Blot" (Reinhart and Malamud, 1982) wurden Harnstoff-Fokussierungsgele geblottet. Nichtionische Detergenzien, die normalerweise bei Fokussierungen verwendet werden, verhindern die Bindung der Proteine an Nitrocellulose und müssen daher sowohl im Gel selbst als auch im Probenpuffer weggelassen werden.

Der isoelektrische Punkt des Antigens wurde mit Hilfe des pH-Gradienten bestimmt (Abb.6C). Abb.6B zeigt Beispiele für Ergebnisse, die mit dem "Fokussierungsblotting" erhalten wurden. Die Antikörper P11 und Q16 erkennen demnach das gleiche Polypeptid (gleiche Banden in SDS- und Fokussierungsgelen) ebenso wie die S5- und T29-Antikörper. Die beiden letzteren reagieren mit einer Reihe von Polypeptiden, die wahrscheinlich Ladungsmodifikationen (z.B. Phosphorylierung) desselben Antigens sind. Der T7-Antikörper, der immer mit 2 Banden in SDS-Gelen reagiert (siehe oben), zeigt nur eine in

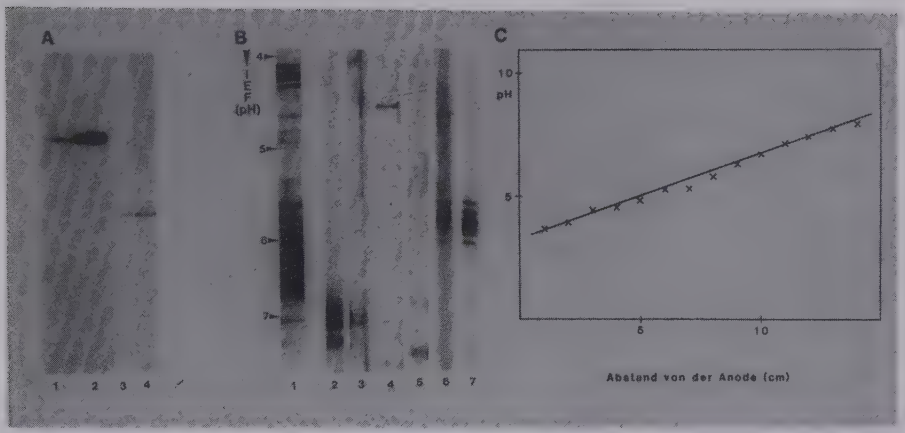


Abb. 6: Bestimmung der Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte der Antigene
In A ist die Autoradiographie eines Western Blot von einem SDS-Polyacrylamidgel mit den Antikörpern T29, S5, Q16 und P11 (Bahnen 1-4) gezeigt. In B und C ist die Bestimmung der isoelektrischen Punkte der Antigene erläutert. Bahn 1 (B) zeigt eine Coomassie-Färbung eines Fokussierungsgels, die Bahnen 2-7 zeigen das Ergebnis (Autoradiographie) eines Blots von Fokussierungsgelen mit den Antikörpern P11, Q16, P46, T7, T29 und S5. Der pH-Gradient der Gele (C) wurde durch die pH-Werte von in H_2O äquilibrierten Gelstückchen (1 cm) festgelegt.

Fokussierungsgelen. Die untersuchten Antigene umfassen eine Sammlung von sauren (P46) bis zu basischen (T7) Nichthistonproteinen.

Alle Antigene, die in Puffs und Interbanden lokalisiert wurden, sowie auch Y55, der nicht in Puffs vorkommt, sind im hnRNP-Extrakt angereichert (Tabelle 2). Dagegen sind vermutliche Kernstrukturproteine verarmt: T40: Kernhülle; P12: Banden bzw. kondensierte Regionen; Ajl: Nukleolus - bleibt intakt (siehe oben).

Der relativ große Anteil des Kernhüllenproteins ist auf durch die Ultraschallbehandlung dissoziiertes Protein

zurückzuführen, weil es auf Sucrosegradienten als lösliches Protein sedimentiert (nicht gezeigt). Alle Antigene, auch die in kleinen Partikeln bzw. als lösliches Protein vorkommenden Antigene (P11, T7, Q18, V4, T40, Y55) werden jedoch nur in unbedeutenden Mengen während der Salz-EDTA-Behandlung (Abb.2) der Kerne extrahiert. Ebenso werden nur etwa 2 % der pulsmarkierten RNS durch diese Behandlung extrahiert. Mit Ausnahme von S5 findet man auch unter den in Abb.4b gezeigten Sedimentationsbedingungen nur wenig Material der angereicherten Antigene im Sediment des Sucrosegradienten (Daten nicht gezeigt).

2. Verteilung im Sucrosegradienten

Ein erster Hinweis für die Assoziaton von Proteinen mit hnRNS wäre eine Kosedimentation beider Moleküle im Sucrosegradienten. Die Proteine von Fraktionen der in Abb.4b gezeigten Gradienten wurden deshalb auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Abb.7a zeigt das Proteinmuster des hnRNP-Extraktes, von vier Gradientenfraktionen und der unlöslichen Kernfraktion. Das Ergebnis eines Western-Blots eines gleichen Gels mit den Antikörpern X4 und S5 und eines anderen Gels mit den Antikörpern Ajl und P11 wurde wegen der Vergleichsmöglichkeit untereinander dargestellt (Abb.7b). In allen Fraktionen wird von einem Antikörper das gleiche Polypeptid erkannt. Die Verteilung der Antigene X4, S5 und P11 ist unterschiedlich im Sucrosegradienten. X4 kommt in den Fraktionen am häufigsten vor, in denen auch die hnRNS angereichert ist (s. Abb.4b). Der als Kontrolle benutzte Ajl-Antikörper findet tatsächlich kaum Antigen in den Gradien-

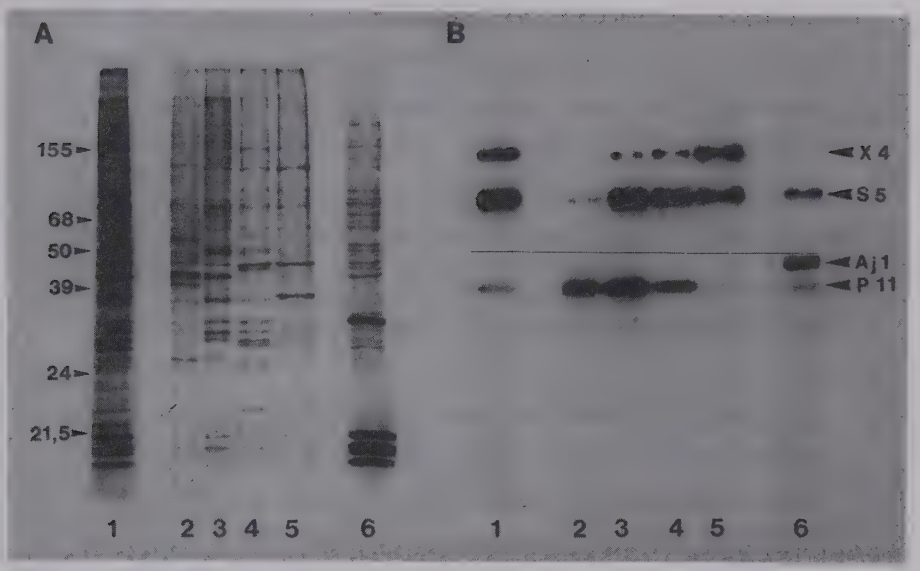


Abb. 7: Verteilung der Antigene X4, S5, P11 und Ajl in Sucrosegradienten nach Analyse durch Western Blot

Die Proteine des hnRNP-Extraktes (Bahn 1), der unlöslichen Kernfraktion (Bahn 6) und Sucrosegradienten-Fraktionen (Bahnen 2 = Fraktionen 1-5, 3 = 6-8; 4 = 9-12, 5 = 13-18) wurden auf 10-17%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Western Blot mit den Antikörpern X4 und S5 bzw. Ajl und P11 getestet. A: Coomassie-Färbung, B: Autoradiographie. Zum Vergleich wurden die Autoradiographien der auf zwei verschiedenen Western Blots analysierten Antikörper untereinander dargestellt. Der Sucrosegradient enthielt 150 mM NaCl (s.Abb.21). Markerproteine wie in Abb.3 und zusätzlich: 155kD: RNS-Polymerase (E.coli, große Untereinheit, Doppelbande); 50 kD: Maus-Gammaglobulin, schwere Kette; 24 kD: Maus-Gammaglobulin, leichte Kette.

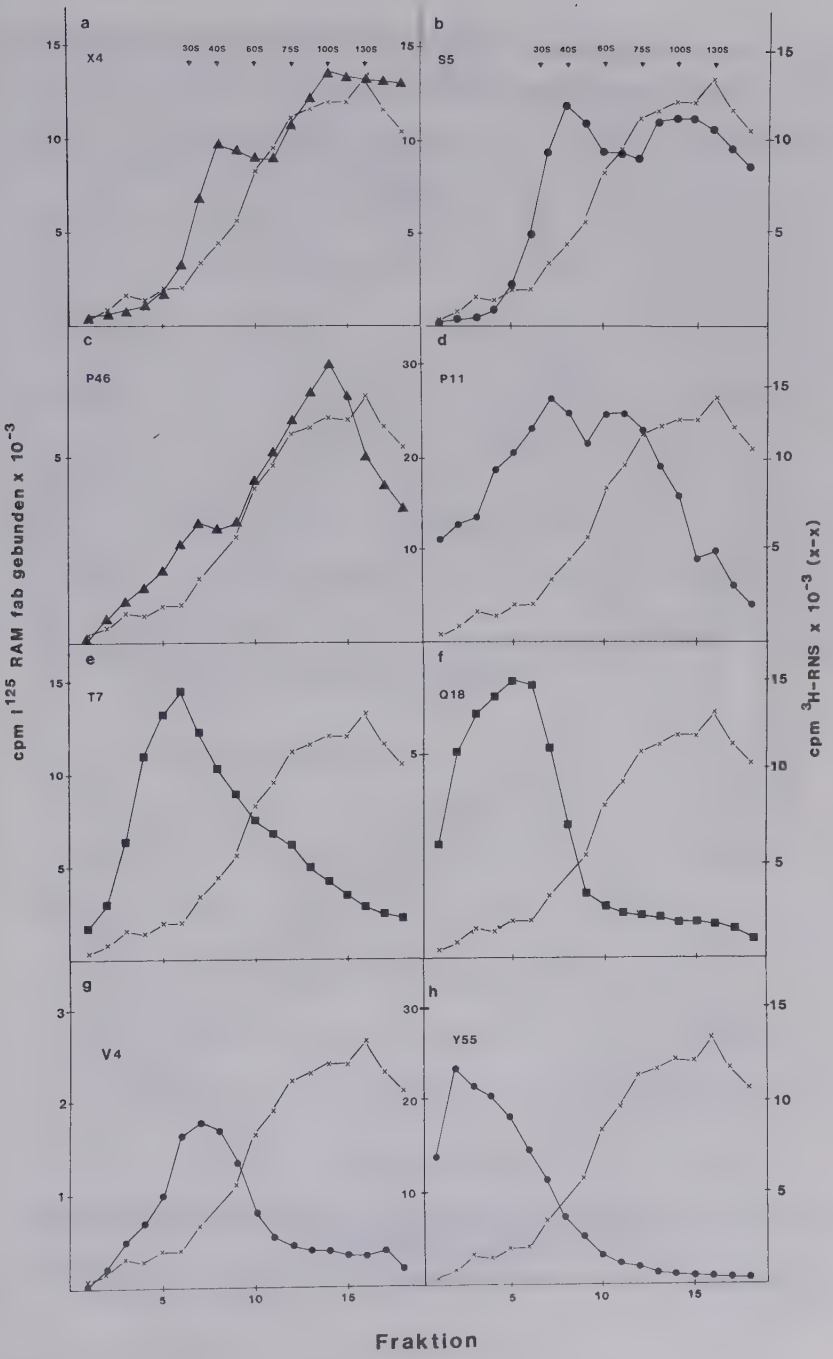
tenfraktionen, sondern kommt fast ausschließlich in der unlöslichen Kernfraktion vor. Die Antigene X4, S5 und P11 sind dagegen im hnRNP-Extrakt angereichert. Die Ergebnisse stimmen mit den durch den RIA gefundenen überein (s. Tabelle 2, S. 23).

Da man diese Art der Analyse gern mit einer größeren Auflösung und quantitativ auswerten möchte, wurden Sucrosegradienten-Fraktionen im RIA getestet und die Verteilung der Antigene studiert. Aus einem SW40-Zentrifugenröhrchen kann man achtzehn 0,6 ml Fraktionen erhalten, die ungefähr je 0,1 mg/ml Protein enthalten. Diese Fraktionen wurden nach Verdünnung als Doppelwerte im RIA auf Antigengehalt getestet. Eine repräsentative Verteilung der Antigene ist in Abb.8 gezeigt.

Versuche dieser Art wurden 3-8mal wiederholt mit sehr reproduzierbaren Ergebnissen (siehe auch Abb. 24, 25, 26). Folgende Schlußfolgerungen lassen sich ziehen:

- Die Antigene sind differentiell verteilt
  - i) hinsichtlich der Verteilung der hnRNS,
  - ii) zueinander.
- Aus der Verteilung zueinander lassen sich die Antigene zunächst in 3 Gruppen einteilen:
  - i) X4, S5, P46: Kosedimentierend mit pulsmarkierter RNS in großen Komplexen (60-150S).
  - ii) P11, T7, V4: Teilweise (P11>T7≥V4) kosedimentierend mit hnRNS, aber auch in größerer Menge in kleinen Partikeln (20-30S) vorkommend.

Abb. 8: Antigenverteilung in Sucrosegradienten nach radioimmunometrischer Analyse: Standardbedingungen
Sucrosegradientenfraktionen wurden 1:10 (bzw.1:30 zur Bestimmung des P11-Antigens) verdünnt und, wie in Material und Methoden beschrieben, im RIA auf Antigengehalt getestet. ^{3}H-RNS wurde durch Säurefällung aus Aliquots der Fraktionen bestimmt (x). Zur unterschiedlichen Menge ^{125}J-RAMfab gebunden, s. Diskussion. Hintergrundwerte sind von allen Werten subtrahiert (s. Material und Methoden).


a
X4
30S 40S 60S 75S 100S 130S
b
S5
c
P46
d
P11
e
T7
f
Q18
g
V4
h
Y55
cpm I 125 RAM fab gebunden x 10-3
cpm 3H-RNS x 10-3 (x-x)
Fraktion

iii) Q18, Y55: Fast ausschließliches (Y55>Q18) Vorkommen in kleinen Partikeln (4-15S).

Die Verteilung der X4-, S5- und P11-Antigene stimmt mit den

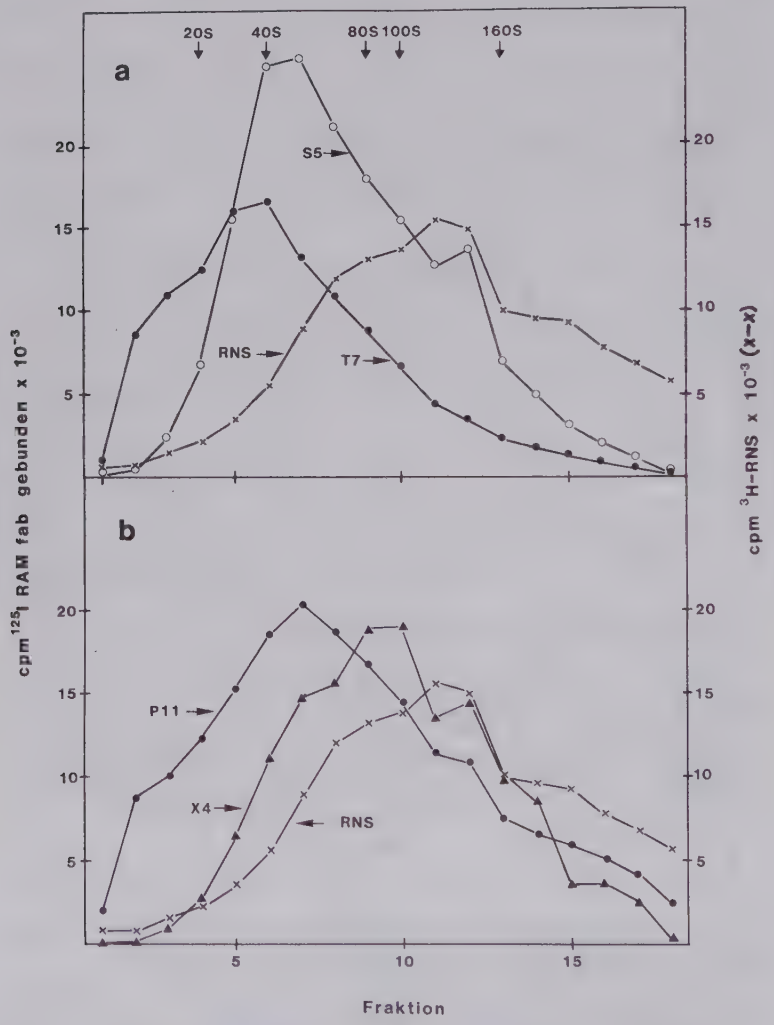


Abb. 9: Antigenverteilung in Sucrosegradienten: Geänderte Zentrifugationsbedingungen

Die Auftrennung der hnRNP-Komplexe erfolgte wie in Abb.4a beschrieben. Die Antigene wurden wie in Abb.8 beschrieben analysiert.

Ergebnissen des Western Blots überein (Abb.7).

Die Antigene der ersten Gruppe sind heterodispers verteilt wie die hnRNP-Strukturen, die Antigene der Gruppe 2 ebenfalls (P11) oder distinkter (T7, V4). Das Q18-Antigen kommt hauptsächlich in einem kleinen Partikel (ca. 10S) vor, und das Y55-Antigen verhält sich wie ein lösliches Protein.

Die Tatsache, daß die Trennung der die Antigene enthaltenden Komplexe besser in diesen als in den kurzzeitzentrifugierten Gradienten gelingt (vgl. Abb.4b), ist in Abb.9 demonstriert. Weiterhin wird deutlich, daß durch das Sedimentieren der Strukturen, die größer als 150S sind, keine besonderen antigenenthaltenden Strukturen verlorengehen.

3. Studien zur RNase- und DNase-Sensitivität der antigenenthaltenden Partikel

a) RNase-Sensitivität

Da die Kosedimentation von Proteinen mit hnRNS auch artifiziell z.B. auf Grund der Sedimentation von RNS-unabhängigen antigenhaltigen Partikeln zustandekommen könnte, wurde gefragt, ob das Vorkommen der Antigene in Partikeln an die Intaktheit der RNS in diesen Partikeln gebunden ist. Dies konnte durch Ribonukleaseverdau der hnRNP-Strukturen vor Auftrennung in Sucrosegradienten nachgewiesen werden (Abb.10-14). Sowohl mit der Methode des Western Blot (Abb.10) als auch mit dem RIA kann man eine dramatische Änderung des Sedimentationsverhaltens mancher Antigene zeigen.

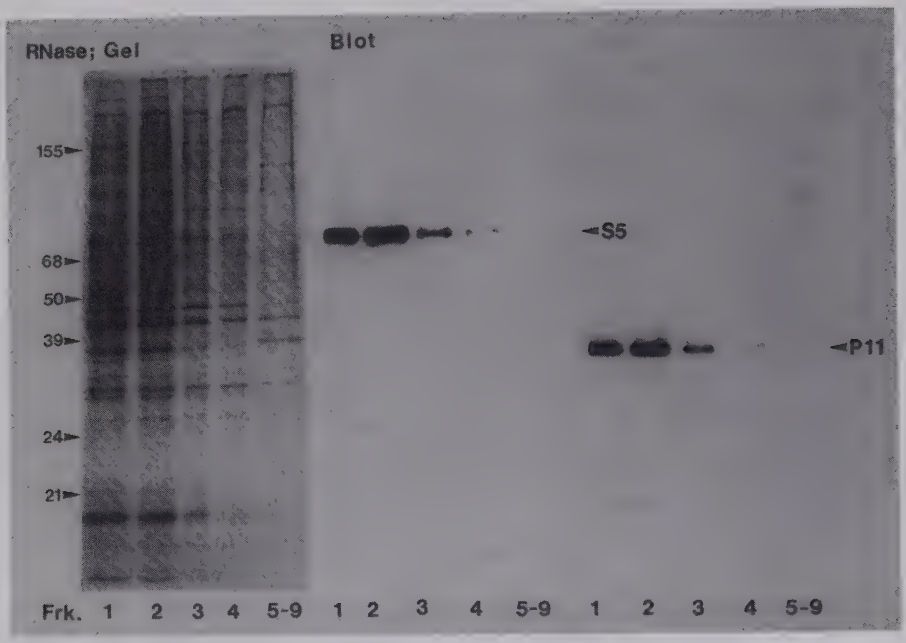


Abb. 10: Antigenverteilung in Sucrosegradienten nach RNase-Behandlung des hnRNP-Extraktes
1 ml des hnRNP-Extraktes wurde 10 min bei 25°C mit 10µg/ml RNase A (hitzebehandelt - 10 min, 90°C -, um evtl. kontaminierende DNase zu denaturieren) verdaut und direkt danach auf Sucrosegradienten aufgetrennt. Der Gradient wurde fraktioniert (neun 1,2ml Fraktionen) und die Proteine auf SDS-Gelen aufgetrennt. Gel: Fraktionen 1,2,3,4,5-9 (5-9 in einer Bahn gesammelt aufgetragen), Coomassie-Färbung; Blot: Western Blot mit den Antikörpern S5 und P11 (Autoradiographie). Markerproteine wie in Abb.7.

Abb.10 verdeutlicht, daß durch die RNase-Behandlung die großen P11- und S5-enthaltenden Strukturen fast vollständig abgebaut worden sind und die Antigene als lösliche Proteine bzw. in Assoziation mit kleinen Partikeln vorkommen. Ein genaueres Bild liefert wiederum die radioimmunometrische Analyse solcher "RNase-Gradienten" (Abb.11).

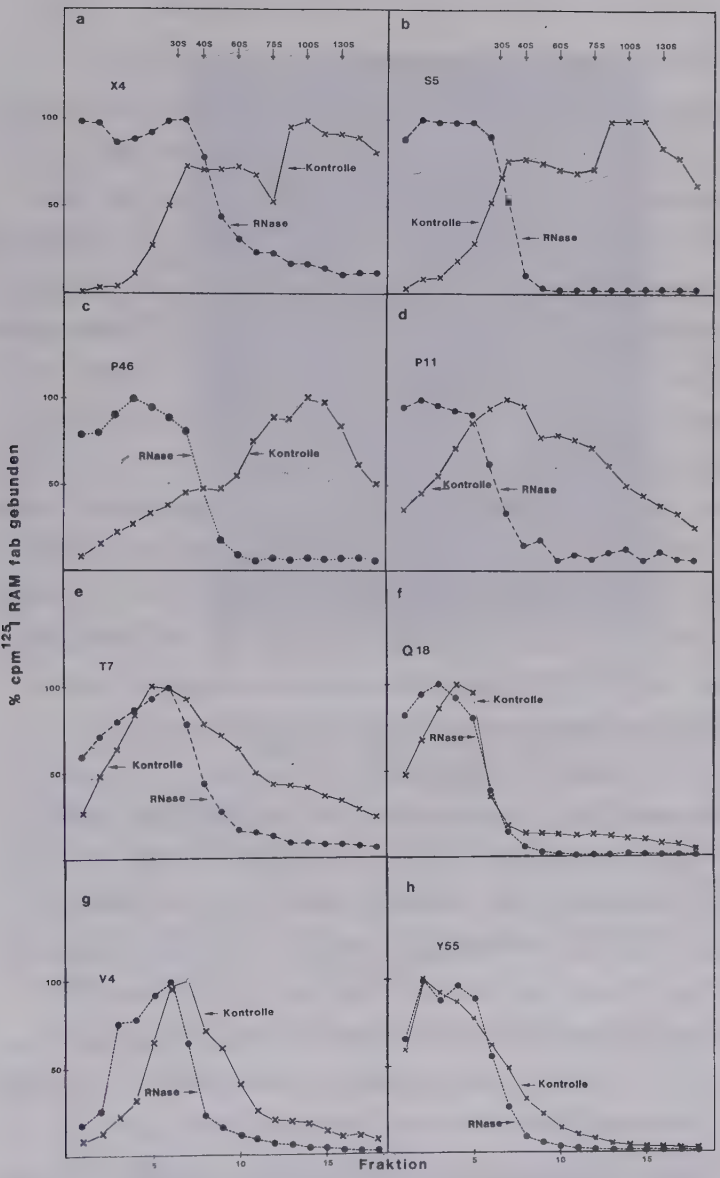


Abb.11: Antigenverteilung in Sucrosegradienten nach RNase-Behandlung des hnRNP-Extraktes

Radioimmunometrische Analyse (s.Abb.8) von Sucrosegradienten. 1ml hnRNP-Extrakt wurde ohne (Kontrolle) oder mit Zusatz von 10µg/ml RNase A (RNase) 10min bei 25°C inkubiert und danach direkt auf Sucrosegradienten aufgetrennt.

Die X4-, S5-, P46- und P11-Antigene zeigen eine eindeutige und starke Abhängigkeit ihrer Assoziation mit hnRNP-Strukturen von der Intaktheit der RNS. Das die Hauptmenge des T7-Antigens enthaltende Partikel (20-30S) hingegen ist nicht RNase-sensitiv, zumindest nicht unter den angewendeten Bedingungen. Die T7-Antigenmenge aber, die mit der pulsmarkierten RNS kosedimentiert, ist nach RNase-Verdau verschwunden. Ähnlich verhält es sich mit den V4- und Q18-Antigenen. Das V4 antigenenthaltende 20-30S-Partikel ist RNase-sensitiv, was allerdings in diesen Gradienten sich nur in einer kleinen Verschiebung der Sedimentation äußert. Eine klare Verschiebung kann in Gradienten nachgewiesen werden, die Partikel von 5-30S auftrennen (nicht gezeigt). Es konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob die ebenfalls geringe Verschiebung des kleinen Q18 antigenenthaltenden Partikels auf RNase-Sensitivität zurückzuführen ist.

b) DNase I-Sensitivität

Da sowohl eine Untersuchung der Proteine des hnRNP-Extrakts (Abb.3) und der Gradientenfraktionen (Abb. 15) als auch die Bestimmung der Menge der Makromoleküle (Tabelle 1) zwar geringe, aber nachweisbare Mengen von Histonen bzw. DNS erbrachte, könnte man eine Beteiligung dieses Chromatin-anteils am Sedimentationsverhalten der Komplexe und der Antigene vermuten. Ausgeschlossen war aber bereits durch die bisher durchgeführten Versuche die Möglichkeit, daß die Antigene X4, S5, P46 und P11 mit DNS statt mit RNS assoziiert sein könnten. Denkbar war, daß Teile der DNS, verpackt mit Protein, noch mit RNS zusammenhängen und daher die becbachtete Größe der hnRNS-haltigen Strukturen beeinflus-

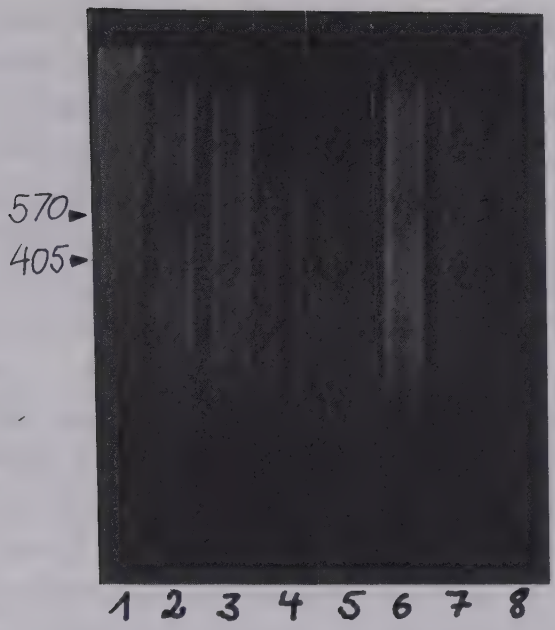


Abb. 12: DNase I-Verdau von DNS aus dem hnRNP-Extrakt
10ug DNS aus dem hnRNP-Extrakt wurden unter den folgenden Bedingungen verdaut: Bahn 1: 60min, 25°C ohne Enzym; Bahn 2: 15min, 25°C, 50µg/ml DNase I; Bahn 3: 30min, 25°C, 50µg/ml DNase I; Bahn 4: 30min, 25°C, 100µg/ml DNase I, Bahn 5: 60min, 25°C, 100µg/ml DNase I; Bahnen 6-8: 2, 5, 15min, 37°C, 50µg/ml DNase I. Der Verdau wurde durch Zugabe von 5mM EDTA gestoppt, die DNS isoliert und auf 8%igen Polyacrylamidgelen analysiert. Als Größenmarker wurden die Restriktionsfragmente eines HaeIII-Verdaus vom Plasmid PBR322 aufgetrennt. Die Größe zweier Fragmente (570 und 405 Basenpare) ist durch Pfeile gekennzeichnet.

sen. Außerdem könnte das T7-Partikel von 20-30S eine besondere Art von DNS-Protein-Komplex sein.

Eine Reihe von Versuchen wurde durchgeführt, um diese Fragen zu beantworten. Zunächst wurden die Bedingungen getestet, unter denen sich die im hnRNP-Extrakt enthaltene DNS möglichst vollständig entfernen läßt. Das Enzym DNase I (Worthington, chromatographisch gereinigt, 2000 U/mg,

0.0005% RNase-Fremdaktivität) wurde in verschiedenen Konzentrationen und Inkubationsbedingungen getestet. Abb.12 zeigt, daß die DNS erst nach längeren Verdauzeiten, höheren Temperaturen oder höheren Konzentrationen des Enzyms bzw. einer Kombination dieser Bedingungen wesentlich kleiner wird.

10µg DNS aus dem hnRNP-Extrakt werden von 100µg DNaseI in einer Stunde bei Raumtempratur von einer Anfangsgröße von $\leq$ 3 kb auf ein Größe von $\leq$ 0,6 kb verkleinert. Das ist kein sehr effizienter Verdau. Die Gründe mögen darin zu suchen sein, daß DNase I zuerst nur Einzelstrangbrüche (nicks) katalysiert und erst danach Doppelstrangbrüche und weiterhin in der möglichen Unzugänglichkeit des Substrates wegen der Komplexierung der DNS durch Protein (s. auch Riley, 1980).

Wenn man den hnRNP-Extrakt diesen Bedingungen unterwirft und danach auf Sucrosegradienten analysiert, erhält man folgende Ergebnisse (Abb.13): Unter Kontrollbedingungen (ohne Enzym, 60min, 25°C) findet man pulsmarkierte, säurefällbare RNS außer in großen Komplexen noch in kleineren (ca. 30S; Abb.13a, 25°C). Eine sehr ähnliche Verteilung erhält man, wenn man den gleichen Extrakt unter den verschiedenen in Abb.12 angegebenen Bedingungen mit DNase I inkubiert (Abb.13d, 100µg/ml DNase I, 60min, 25°C). Bei 0°C ohne Enzym inkubierter Extrakt zeigt keine definierten kleineren Partikel (Abb.13a, 0°C). Anwendung von RNase A in der Konzentration, die der Fremdaktivität der DNaseI-Verunreinigung entspricht (0.0005% von 100µg $\hat{=}$ 0.5 ng RNase) führt zu einer ähnlichen Verteilung wie der mit DNaseI allein enthaltenen (Abb.13d, RNase A). Daraus kann man schließen, daß

- das Sedimentationsverhalten der hnRNP-Strukturen weit-

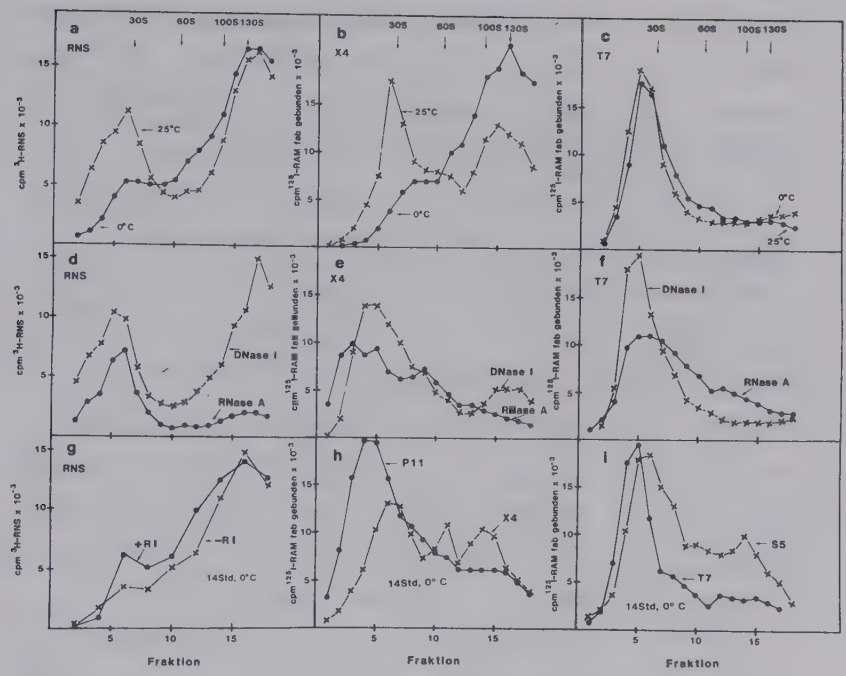


Abb. 13: Verteilung von Antigenen und pulsmarkierter RNS nach RNase A bzw. DNase I-Verdau
Der hnRNP-Extrakt wurde unter verschiedenen Bedingungen mit oder ohne Enzyme inkubiert und auf Sucrosegradienten (Standardbedingungen) aufgetrennt. Erläuterungen siehe Text.

gehend unabhängig von der Größe der DNS ist,

- der hnRNP-Extrakt eine endogene RNase-Aktivität enthält,
- es möglich ist, durch geringe RNase-Konzentrationen (oder endogene RNasen) Partikel (ca.30S) zu erzeugen, die der Größe der Core-Partikel aus anderen Spezies entspricht (s. Einleitung).

Die endogene RNase-Aktivität wird am besten durch niedrige Temperatur inhibiert (Abb.13a, vgl. 25°C, 0°C; 13g:

14Std. 0°C: - RNase-Inhibitor (RI)), auch zugesetzte RNase-Inhibitoren (Vanadylkomplexe: Berger and Birkenmeier (1979); Rattenleberüberstand (RLS): Blobel and Potter, 1966) haben entweder keinen Effekt (Abb.13g, +RI = RLS) oder ändern das Sedimentationsverhalten der Komplexe (nicht gezeigt).

Wie verhalten sich nun die Antigene unter den verschiedenen Bedingungen? Das X4-Antigen zum Beispiel (ähnlich verhalten sich die S5- und P11-Antigene) kosedimentiert weitgehend mit der hnRNS (Abb.13b,e). Überraschend ist, daß nach 14-stündiger Inkubation bei 0°C (14 Std. 0°C in Abb.13h,i) beträchtliche Mengen der Antigene (X4, S5 und P11) in kleineren Komplexen sedimentieren als nach der Verteilung der pulsmarkierten RNS (Abb.13g) zu erwarten wäre. Dieser Effekt soll unter dem Namen "Alterungseffekt" noch in der Diskussion und Teil IV weiter behandelt werden.

Das T7-Antigen (Abb.13c,f,i) zeigt keine bedeutende Änderung des Sedimentationsverhaltens unter den verschiedenen Bedingungen. Die Variabilität des Vorhandenseins in großen Komplexen ist darauf zurückzuführen, daß die Gradienten in verschiedenen Radioimmuntests ausgetestet wurden, in denen unterschiedliche Mengen des ^{125}J-markierten RAMfab-Antikörpers eingesetzt und gebunden wurden. Das 20-30S-Partikel, das die Hauptmenge des T7-Antigens enthält, ist jedenfalls weder DNase I- noch RNase A-sensitiv. Auch Versuche mit Ribonuklease U2 (katalysiert die Spaltung an Adenin-enthaltenden Ribonucleotiden) und RNase T1 (spaltet neben Guanosinresten - RNase A spaltet neben Pyrimidinresten) ließen dieses Partikel ebenfalls intakt (nicht gezeigt), so daß dieses Partikel wahrscheinlich entweder nur aus Protein

besteht oder eine stark gegen Verdau geschützte DNS oder RNS oder doppelsträngige RNS beinhaltet.

4. "Reverse RIA"

Der Nachweis, daß auch die vergleichsweise geringen Mengen der P11- und T7-Antigene, die in Gradienten mit hnRNS kosedimentieren, tatsächlich mit dieser assoziiert sind, gelang durch eine neuartige immunologische Methode. Dieser "Reverse RIA" genannte Test ist, wie der Name schon sagt, eine Umkehrung des normalen RIA. Wie in Abb.14a schematisch dargestellt, wurde im "Reverse RIA" gereinigter monoklonaler Antikörper anstelle des Antigens wie im normalen RIA an die Plastikoberfläche gebunden. Nach Absättigung der freien Proteinbindungskapazität der Oberfläche wurden Aliquots von allen Fraktionen des Sucrosegradienten mit den immobilisierten Antikörpern inkubiert. Sofern der Antikörper Komplexe, die neben dem Antigen pulsmarkierte RNS enthalten, bindet, kann die Menge dieser RNS nach Entfernung ungebundenen Materials bestimmt werden. Abb.14b zeigt, daß alle getesteten Antikörper derartige Komplexe spezifisch binden. Unspezifische Bindung wurde durch immobilisiertes Maus-IgG anstelle des monoklonalen Antikörpers ermittelt. Die in Abb.14b aufgeführten Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, von denen die entsprechenden mit Maus-IgG erhaltenen Werte bereits abgezogen sind.

Ein Vergleich zwischen der eingesetzten Menge pulsmarkierter RNS in Abb.14b und der tatsächlich gebundenen Menge macht deutlich, daß bestenfalls 10% gebunden werden. Dies ist zurückzuführen auf die limitierte Menge an Antikörper,

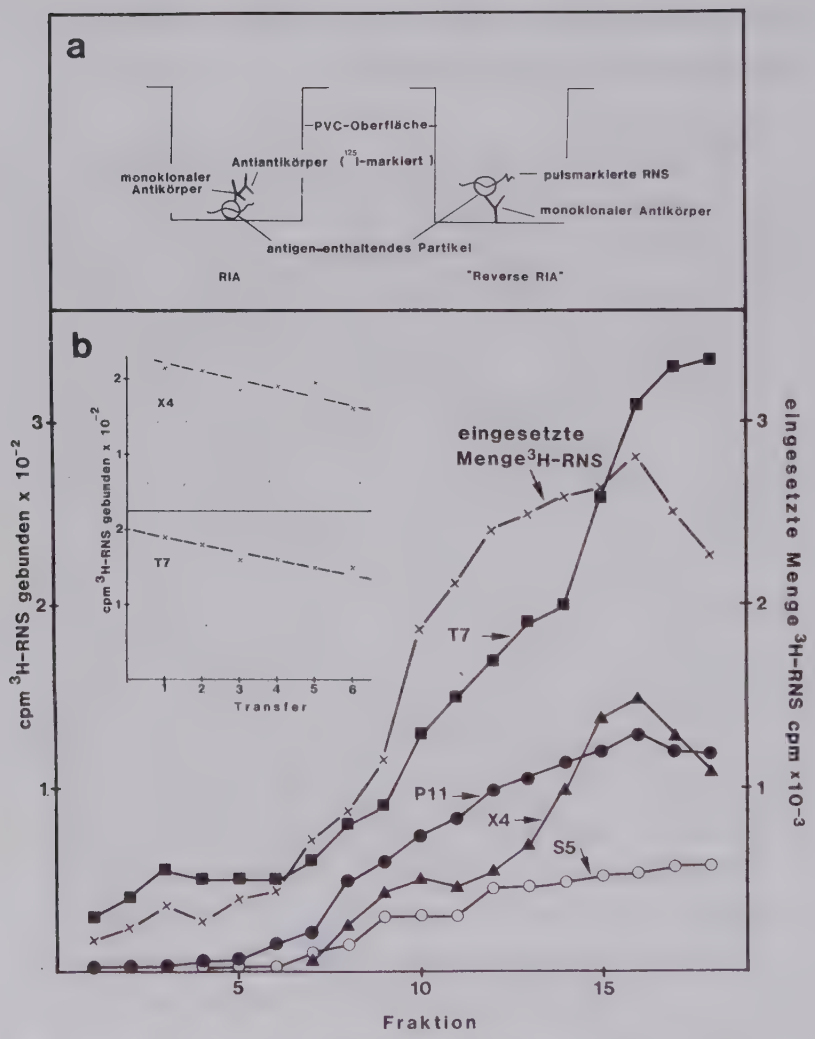


Abb. 14: Bindung von Sucrosegradienten-gereinigten hnRNP-Komplexen an immobilisierte monoklonale Antikörper: Reverse RIA

In a ist eine schematische Darstellung des Testverfahrens dargestellt. In b sind die von den monoklonalen Antikörpern gebundenen Mengen pulsmarkierter RNS mit dem Namen des Antikörpers gekennzeichnet (linke Ordinate). Die eingesetzte Menge pulsmarkierter RNS pro Gradientenfraktion ist der rechten Ordinate zu entnehmen (x). Die Innenabbildung in b zeigt die Ergebnisse eines Serientransfertests. In diesem

die an die Oberfläche gebunden werden kann, denn sowohl Verdünnungen der Sucrosegradienten-Fraktionen als auch Serientransfers desselben Aliquots zu neu an Oberflächen gebundenen Antikörpern zeigten, daß immer noch eine fast gleich große Menge pulsmarkierter RNS gebunden wurde. Ein Serientransfertest mit den Antikörpern X4 und T7 ist in Abb.14b gezeigt. Aus dem gleichen Grund ist die Menge der gebundenen RNS stark abhängig von der Reinheit des Antikörpers. Der S5-Antikörper, der die geringste Menge RNS bindet, enthielt, wie sich später herausstellte, auch die meisten Verunreinigungen (Peter Symmons, persönliche Mitteilung).

Es soll jedoch Wert auf die Feststellung gelegt werden, daß eine hundertprozentige Bindung der pulsmarkierten RNS nicht erwartet wurde, weil

- die Antigene wahrscheinlich nicht in allen hnRNS enthaltenden Partikeln vorkommen (s.III),
- vermutlich beträchtliche Mengen der Antigene während der Inkubationsbedingungen von hnRNS bzw. hnRNP dissoziieren (s. Alterungseffekt II,3).

Die P46-, Q18 und V4-Antikörper lagen noch nicht in gereinigter Form vor.

Ungeachtet der genannten Einschränkungen ist offensichtlich, daß die getesteten Antigene (Abb.14) in der Lage sind, spezifisch mit hnRNS zu assoziieren, auch die P11- und T7-Antigene.

Test wurde nach jeweils 2 Std. ein Aliquot Sucrosegradientenfraktion von einer der mit Antikörper besetzten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zur nächsten transferiert und die jeweils gebundene Menge pulsmarkierter RNS bestimmt. Weitere Erläuterungen im Text und in Material und Methoden.

Dieses Ergebnis ermutigte zu weitergehenden Versuchen, nämlich mit Hilfe des "Reverse RIA" nachzuweisen, daß in einem Komplex, der z.B. das P11-Antigen enthält, auch noch andere Antigene vorkommen. Zur Durchführung kamen Versuche, in denen nach der Entfernung ungebundenen Materials die Bindungsstellen des monoklonalen Antikörpers mit RAM fab-Antikörper abgesättigt werden sollten, danach ein zweiter monoklonaler Antikörper mit den gebundenen Komplexen reagieren und dieser durch ^{125}J-RAM fab Antikörper nachgewiesen werden sollte. Ein zu hoher Hintergrund (starke Bindung von ^{125}J-RAM fab in Kontrollen) auch bei Versuchen mit direkt radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern ließ diese Experimente aber scheitern. Andere Ansätze zur Beantwortung der gleichen Fragestellung sind in Teil V,2 aufgezeigt.

III. Einteilung der hnRNP-Proteine in Verpackungs- und Nichtverpackungsproteine

1. Identifizierung der Verpackungsproteine der hnRNS

a) Eindimensionale Gelelektrophorese

Zur Aufdeckung der Funktion der mit hnRNS assoziierten Antigene war es notwendig, ihre Beziehung zu den sogenannten Verpackungs- oder Core-Proteinen der hnRNS bzw. ihre mögliche Identifizierung als eben solche sicherzustellen. Im Gegensatz zu Vertebraten (s. Einleitung) waren diese Proteine bei Drosophila noch nicht identifiziert. In Analogie zu deren Eigenschaften in Vertebraten wurde angenommen, daß es sich um basische (s.z.B. Beyer et al., 1977; Peters and

Comings, 1980), häufig vorkommende Nichthistonproteine handeln muß, die mit hnRNS kosedimentieren.

Die Proteinzusammensetzung verschiedener subnukleärer Fraktionen ist in Abb.15 dargestellt. Auf angereicherte Proteine im hnRNP-Extrakt (Bahn 1) im Vergleich zur unlöslichen Fraktion (Bahn 20) wurde bereits in Abb.3 hingewiesen. In Übereinstimmung mit den Daten in Tabelle 1 sind im Pellet des Gradienten (Bahn 19) neben einigen anderen Polypeptiden besonders die Histone stärker vertreten als im Gesamtgradienten. Die Analyse des Polypeptidmusters der Sucrosegradienten-Fraktionen (Bahnen 2-18) ergibt, daß einige Proteine spezifisch in dem Teil des Gradienten angereichert sind, in dem hnRNS sedimentiert. Unter diesen sind die häufigen Proteine, und demnach die vermutlichen Verpackungsproteine der hnRNS, mit Pfeilen gekennzeichnet. Es handelt sich um Proteine der Molekulargewichte 54000 D und 52000 D (Doppelbande), 39000 D und 27000 D. Die meisten dieser Proteine (außer dem 39000 D Protein) unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht von den Verpackungsproteinen der Vertebraten-hnRNS. Als Vergleich ist die Gruppe der sechs zusammengehörigen HeLa-hnRNP-Core-Proteine gezeigt (Bahn 21, Klammer; Beyer et al., 1977). Eine derartige Proteingruppe findet man bei Drosophila weder im hnRNP-Extrakt noch in irgendwelchen Gradientenfraktionen. Die HeLa-Proteine haben in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung und ihrem Molekulargewicht starke Ähnlichkeit mit Core-Proteinen anderer Vertebraten (Pederson, 1974; Martin et al., 1977; Beyer et al., 1977).

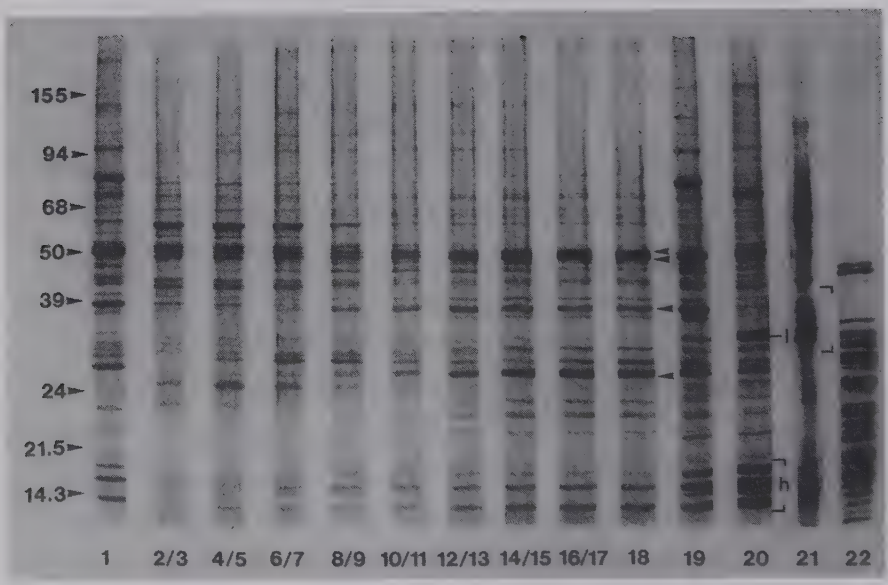


Abb. 15: Polypeptidmuster subnukleärer Fraktionen
Die Proteine des hnRNP-Extraktes (Bahn 1), der Sucrosegradientenfraktionen (2-18), des Gradientenpellets (19), der unlöslichen Kernfraktion (20), HeLaRNP-Proteine (21) und Drosophila-Ribosomen (22) sind auf einem 10-17%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt worden (Coomassie-Färbung). Die beiden letzteren Fraktionen sind ein Geschenk von S. Kobus. Die Pfeile in Bahn 18 weisen auf vermutliche hnRNP-Verpackungsproteine hin. 1 in Bahn 20 ist Histon HI, h sind die Core-Histone. Die Klammer in Bahn 21 umfaßt die HeLa-RNP-Verpackungsproteine. Markerproteine wie in Abb.7, zusätzlich 94 kd: Phosphorylase a; 14,3 kD: Cytochrom c.

Neben ihrer Häufigkeit haben manche Core-Proteine auch starke ionische Wechselwirkungen mit der hnRNS (Beyer et al., 1977). Um festzustellen, ob dies für die Drosophila-Proteine auch zutrifft, wurde der hnRNP-Extrakt auf 0,3M NaCl eingestellt und in einem Gradienten gleichen Salzgehalts analysiert. Abb.16 zeigt, daß viele Polypeptide (u.a.

viele Antigene, s.III,2c), die bei 0,1M Salz mit hnRNS kosedimentieren, unter 0,3M Salz abgelöst werden und praktisch auf dem Gradienten liegenbleiben, wohingegen die vermutlichen Verpackungsproteine weiterhin mit der hnRNS kosedimentieren (Sedimentation der hnRNS unter 0,3M NaCl, s.Abb.21h).

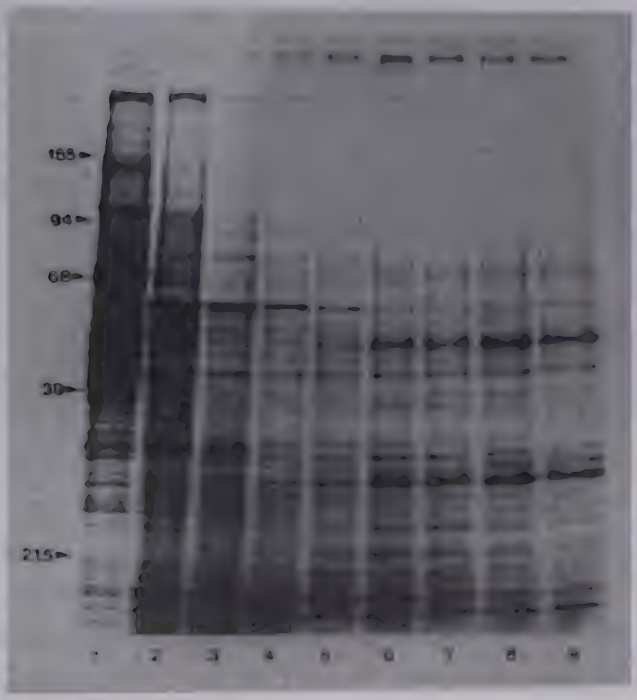


Abb. 16: Proteinmuster der Sucrosegradienten-Fraktionen nach Analyse in 0,3M NaCl
Der hnRNP-Extrakt wurde auf 0,3M NaCl eingestellt und in Sucrosegradienten mit entsprechendem Salzgehalt zentrifugiert. Neun 1,2ml Fraktionen wurden gesammelt und die Proteine auf einem 10-17%igen SDS-Polyacrylamidgradientengel analysiert (Coomassie-Färbung). Markerproteine wie in Abb.7.

b) In vivo Vernetzung von RNS und Protein

Proteine, die an RNS binden, können mit dieser durch UV-Bestrahlung kovalent verbunden werden. Mit dieser Methode konnten die HeLa-Core-Proteine an hnRNS vernetzt werden, und auch polyA-bindende Proteine wurden mit dieser Methode identifiziert (Setyono and Greenberg, 1980). Es ist jedoch umstritten, ob alle sechs HeLa-Proteine mit hnRNS vernetzt werden können (Setyono and Greenberg, 1980; van Eekelen and van Venroij, 1980). In jedem Fall jedoch sind Hauptproteine, die mit hnRNS vernetzbar sind und nicht an polyA binden, Verpackungsproteine der hnRNS. Da Dr.Buddy Setyono bereit war, mir die Technik der UV-Vernetzung zu zeigen, bot sich die Möglichkeit, diese Methode auf Drosophila hnRNP-Strukturen anzuwenden.

Drosophila-RNS-Protein-Komplexe wurde in vivo durch UV-Bestrahlung vernetzt und danach der hnRNP-Extrakt in der üblichen Weise präpariert. Nicht vernetzte Proteine wurden dann durch 0,5% SDS und 0,5M NaCl von der RNS dissoziiert und von den vernetzten RNS-Protein-Komplexen durch Oligo-dT-Zellulose abgetrennt. Die Proteine der gebundenen Komplexe wurden nach der Elution und RNase-Verdau auf SDS-Gelen analysiert, oder, zur Identifizierung des polyA-bindenden Proteins, eluiert, RNase A-verdaut und erneut über Oligo-dT-Zellulose aufgetrennt. Der gebundene polyA-Protein Komplex wurde danach eluiert, RNaseT2- (spaltet unspezifisch an allen Basen, auch Adenin) verdaut und analysiert. Abb.17 zeigt, daß zwei Hauptproteine mit dem Molekulargewicht 39000 D* und

*Wegen der Abweichung des 39000D-Eichproteins von der Eichkurve stimmt die Mobilität dieses und des 39000D-Verpackungsproteins in den Gelen nicht überein.

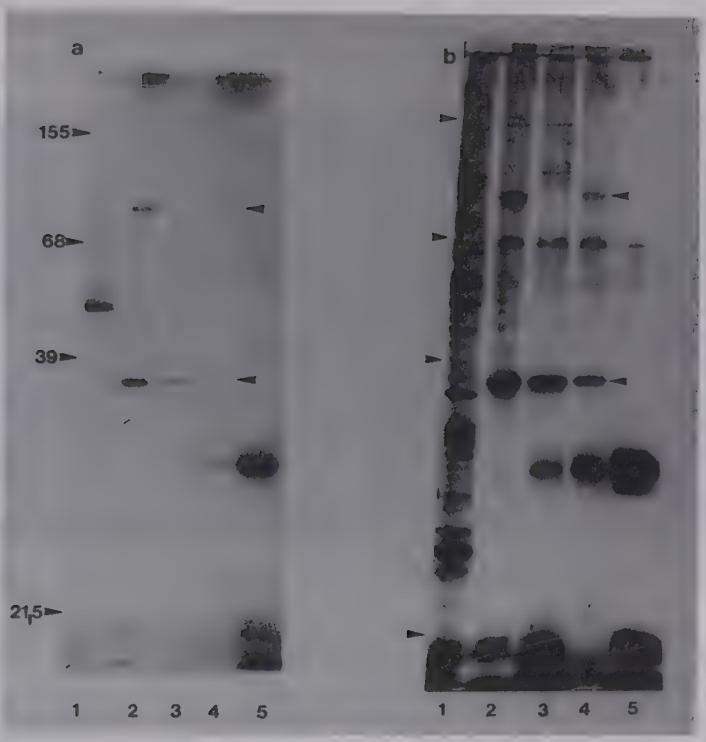


Abb. 17: UV-Vernetzung von RNS und Protein
Das gleiche SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) ist in a (Coomassie-Färbung) und b (sensitivere Silberfärbung nach Morrissey, 1981) gezeigt. Bahn 1: hnRNP-Extrakt, Bahn 2: oligo-dT-Zellulose-gebundene Fraktion, Bahn 3: oligo-dT-Zellulose-ungebundene und gebundene (Bahn 4) Fraktion nach RNase A- und T1-Verdau der gebundenen Fraktion. Bahn 5: Mischung der RNasen A, T1 und T2. Die Markerproteine in a und b sind gleich (s. Abb.7).

92OCO D an Drosophila-RNS vernetzt wurden (Pfeile). Das 39OOOD-Protein ist nach RNase-Verdau in der von Oligo-dT-Zellulose ungebundenen Fraktion und demnach ein hnRNP-Verpackungsprotein, das 92000D-Protein ist dagegen in der

gebundenen Fraktion und demnach das polyA-bindende Protein der Drosophila hnRNS.

c) Zweidimensionale Gelelektrophorese

Durch die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese werden Proteine zunächst durch die isoelektrische Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt und danach durch SDS-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht. Basische Proteine werden unter den üblichen Bedingungen einer äquilibrierten (alle Proteine haben ihren I.P. erreicht) isoelektrischen Fokussierung nicht aufgetrennt (O`Farrell, 1975). Zur Analyse dieser Proteine benutzt man die NEPHGE (Non-equilibrated-pH-Gradient Electrophoresis; O`Farrell et al., 1977), bei der die Elektrophorese gestoppt wird, ehe alle Proteine den pH ihres isoelektrischen Punktes erreicht haben. Peters und Comings (1980) haben diese Technik systematisch benutzt, Kernproteine und auch hnRNP-Proteine aufzutrennen.

Dieser Methode wurde weitgehend gefolgt, um die basischen Proteine des hnRNP-Extraktes zu analysieren. Abb.18b zeigt, daß ein markantes Hauptprotein basisch ist (Pfeil). Ein Vergleich mit im gleichen SDS-Gel aufgetrennten hnRNP-Extraktproteinen (Abb.18a) läßt erkennen, daß es sich um das 54000D-Protein handelt. Das 52000D-Protein ist weniger basisch, ebenso wie das 27000D-Protein (offene Pfeilspitzen). Das 39000D-Protein bleibt dagegen auf dem NEPHGE-Gel liegen (nicht gezeigt). Auf Abb.18c wird in III, 2a eingegangen.

Keines der vier durch ihre Häufigkeit, Anreicherung und Kosedimentation mit hnRNS als potentielle Verpackungsproteine vorgestellten Polypeptide kann durch die in diesem

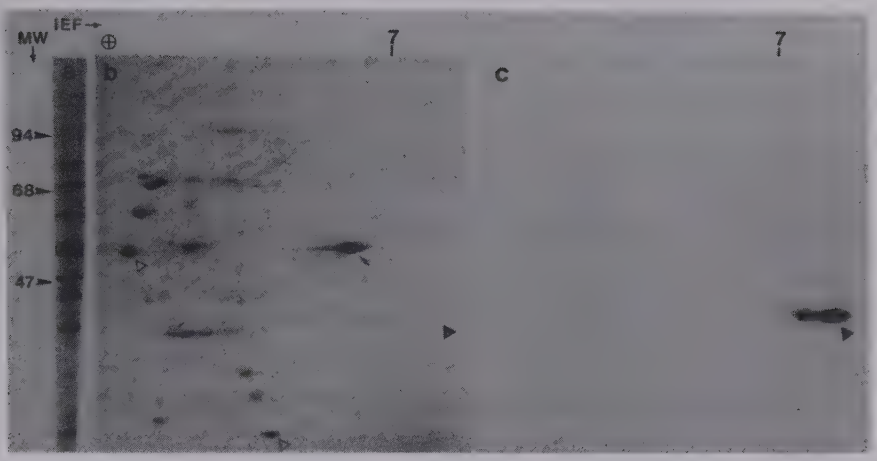


Abb. 18: Zweidimensionale Gelelektrophorese des hnRNP-Extraktes

Die Proteine des hnRNP-Extraktes wurden auf 2D-Gelen aufgetrennt, wie in Material und Methoden beschrieben (b). a zeigt zum Vergleich die Auftrennung der gleichen Proteine nur in der zweiten Dimension (SDS-Gel) auf dem gleichen Gel wie b. c: Western Blot eines 2D-Gels mit dem P11-Antikörper. Die Pfeile weisen auf identifizierte Polypeptide hin (s. Text). Markerproteine: 94 kD: Phosphorylase a; 68 kD: Rinderserumalbumin; 47 kD, IP 7: Phosphoglyceratkinase; Die Mobilität dieser Proteine wurde auf parallen 2D-Gelen ermittelt.

Kapitel beschriebenen Versuche (III, 1a-c) von dieser Rolle ausgeschlossen werden. Relativ gesichert ist diese Funktion für die 54000D- und 39000D-Proteine, weil sie sowohl durch ihre Kosedimentation mit pulsmarkierter RNS als auch durch ihre Basizität bzw. UV-Vernetzbarkeit mit RNS unabhängige Kriterien für Verpackungsproteine der hnRNS erfüllen.

2. Evidenzen für die Rolle der Antigene beim Processing der hnRNS

a) Qualitative Aspekte

Nachdem feststand, welche Proteine wahrscheinlich für die Verpackung der hnRNS verantwortlich sind, war es überraschend festzustellen, daß die meisten der untersuchten Antikörper nicht gegen diese Proteine gerichtet sein konnten. Dies geht zunächst hervor aus dem Vergleich der Molekulargewichte der Antigene, mit denen der Verpackungsproteine und speziell aus einer genauen Analyse von Western Blots (wie in Abb.7 gezeigt) im Vergleich mit Gelen (wie in Abb.15). Die Antigene X4, S5, T7 und P46 lassen sich dadurch von vornherein als mögliche Verpackungsproteine ausschließen.

Das T7-Antigen ist auch schon durch sein Sedimentationsverhalten ausgeschlossen, wie auch die V4- und Q18-Antigene. Letzteres hat zwar ein ähnliches Molekulargewicht wie das 54000D-Verpackungsprotein, sedimentiert aber völlig anders (s.Abb.8 und Western Blots, nicht gezeigt).

Schwieriger zuzuordnen ist das P11-Antigen. Im SDS-Gel hat es vom Molekulargewicht her eine enge Nachbarschaft zum 39000D-Protein. Es kosedimentiert zwar nicht in gleicher Weise mit hnRNS (s. Abb.8), bindet aber die größte Menge ^{125}J-RAM fab im RIA im Vergleich zu den anderen Antikörpern. Eine klare Unterscheidung ist durch die 2D-Gelelektrophorese möglich. Die Ergebnisse in Abb.18a und b sind bereits erläutert worden. Abb.18c zeigt einen Western Blot von einem 2D-Gel mit dem P11-Antikörper. Es ist klar, daß dieses Antigen (gefüllte Pfeilspitze) in weit geringerer Menge vorhanden

ist als die Verpackungsproteine, noch basischer ist als das 54000D-Protein und klar verschieden ist von dem 39000D-Protein. Weitere Evidenzen für die Unabhängigkeit der meisten Antigene von der Verpackung der hnRNS sind in III,2c aufgeführt.

b) Quantifizierung der Antigenmenge

Eine quantitative Aussage über die Menge eines bestimmten Antigens wäre von großem Nutzen für die Bestimmung der Sensitivität der benutzten Nachweismethoden (RIA, Immunfluoreszenz, Blot) und die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, bei der Immunisierung mit komplexen Proteinmischungen Antikörper gegen seltener vorkommende Polypeptide zu erhalten. Außerdem würde die Kenntnis der Kopienzahl eines Polypeptids Aussagen über eine Beteiligung an z.B. strukturellen oder katalytischen Funktionen erlauben. Densitometrische Verfahren bzw. die Messung der Radioaktivität eines bestimmten Proteins in einer Mischung werden üblicherweise zur quantitativen Bestimmung eines Makromoleküls eingesetzt (Peterson and McConkey, 1976).

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist eine bewährte Methode, Proteine aufzutrennen. Kernproteine stellen aber eine heterogene Mischung von Proteinen dar, die durch ihre Unlöslichkeit die quantitative Analyse erschweren. Folgende Voraussetzungen müssen deshalb erfüllt sein, die Menge eines Proteins in einem 2D-Gel quantitativ bestimmen zu können:

i) Die Gesamtmenge des ursprünglich vorhandenen Polypeptids der Zellen muß im Gel vorhanden sein, d.h. weder

darf ein Teil auf dem Gel bzw. Auftragspunkt präzipitieren, in Lösung verbleiben oder zum anderen Pol wandern, noch dürfen bei der Auftrennung und Analyse zellulärer Subfraktionen Teilmengen dieser Polypeptide in anderen Fraktionen vorhanden sein.

Diese Bedingung ist für Kernproteine, zumindest für viele von ihnen, nicht oder nur durch verschiedene auf bestimmte Polypeptide zugeschnittene Solubilisierungsverfahren zu erfüllen. In 8M Harnstoff sind Kernproteine jedoch relativ gut löslich. Es bildet sich aber immer ein Präzipitat auf dem Fokussierungsgel. Um deshalb ein Maß für die tatsächlich im Gel aufgetrennte Menge eines bestimmten Polypeptids zu erhalten, wurden bekannte Mengen von Markerproteinen den Kernproteinen beigemischt. Sie dienten damit zur Eichung der Menge des zu bestimmenden Polypeptids, sofern man ein durchschnittlich gleiches Verhalten (Präzipitation und Färbbarkeit) bei allen Proteinen voraussetzen kann. Es ist aus Immunfluoreszenz und RIA-Daten bekannt, daß die untersuchten Antigene nur im Kern (s. Abb.28) bzw. den analysierten Kernproteinen vorkommen.

ii) Die molekulare Beschaffenheit des Polypeptids muß bekannt sein, d.h. ob es z.B. in unterschiedlichen Ladungsformen vorkommt (phosphoryliert etc.), was unterschiedliche isoelektrische Punkte zur Folge hat, oder ob es sensitiv gegen Proteasen ist, so daß Peptide unterschiedlichen Molekulargewichts entstehen.
Im Fall der Bestimmung von Antigenmengen ist diese Forderung erfüllt, weil mit Hilfe des Western Blot

klare Aussagen gemacht werden können. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber bisherigen Bestimmungen von Polypeptiden in Proteinmischungen.

iii) Die Nachweismethode selbst muß auf alle Komponenten des Systems gleichermaßen anwendbar sein. Deshalb muß z.B. bei der Messung der spez. Radioaktivität diese proportional der Menge in alle Polypeptide eingebaut sein oder, z.B. bei der Bestimmung einer Färbungsintensität, nachgewiesen werden, daß sich gleiche und unterschiedliche Proteine gleich und proportional ihrer Menge anfärben lassen.

Anhand der Abb.19 soll erläutert werden, wie die Antigenmenge quantitativ bestimmt wurde.

Gesamtkernproteine wurden durch Harnstoff und Triton-X100 in Lösung gebracht und nach isoelektrischer Fokussierung in Röhrchengelen (äquilibrierte oder NEPHGE-Gele) in der zweiten Dimension auf SDS-Gelen aufgetrennt. Markerproteine bekannter Menge wurden entweder getrennt oder nach Beimischung zu Gesamtkernproteinen analysiert. Abb.19 zeigt die Auftrennung der Markerproteine (a) und ihre entsprechende Position in Gesamtkernproteinen (b) in einem äquilibrierten Fokussierungsgel. Man sieht deutlich, daß weniger an Markerprotein im Kernproteingel (b) vorhanden ist im Vergleich zum Markergel (a), was schon auf den Verlust an Gesamtkernprotein durch Präzipitation o.ä. (s.o.) hindeutet.

Die Auftrennung der Kernproteine ist annehmbar, aber nicht optimal, weil die Gele wegen der geringen Kopienzahl der Antigene überladen werden mußten. In manchen Fällen sind auch Eichproteine durch andere Proteine verdeckt und können

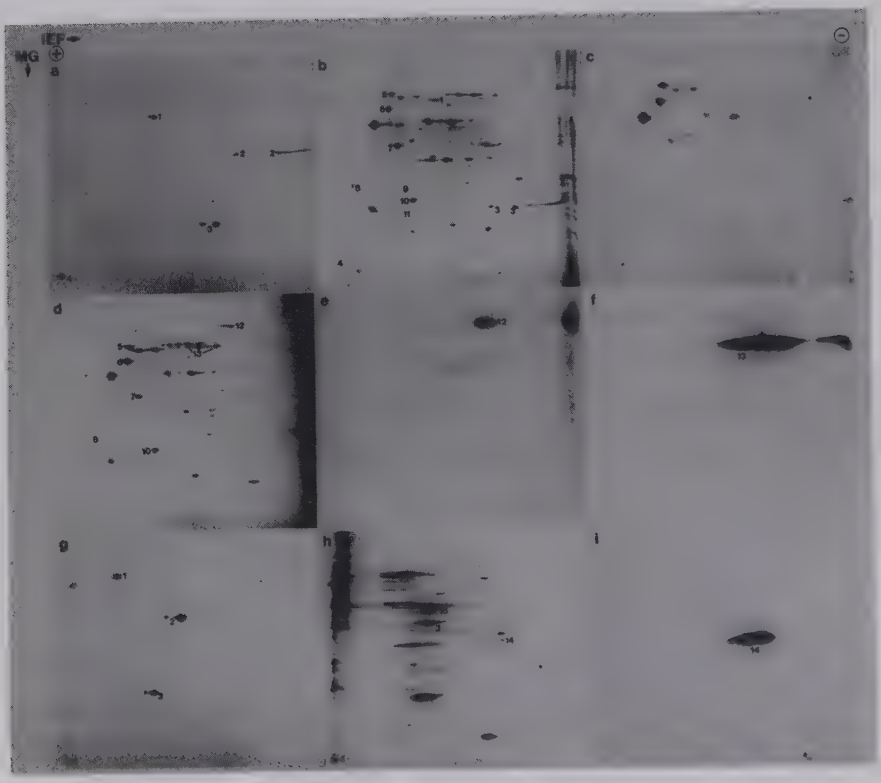


Abb. 19: Quantitative Bestimmung der Antigenmenge
Gesamtkernproteine (≙ 6x10 Kerne) wurden auf 2D-Gelen aufgetrennt (b-f: äquilibrierte Fokussierungsgele, g-i: NePHGE-Gele). a, d und g zeigen die Auftrennung der benutzten Eichproteine (Peters and Comings, 1980) in äquilibrierten (a und d)) bzw. NEPHGE- (g) Gelen. Durch bidirektionalen Transfer (Bowen et al., 1980) erhält man eine getreue Kopie des Gels (c: Amidoschwarz-Färbung der Nitrozellulose nach Blot von einem 2D-Gel wie in b). e und f zeigen die Ergebnisse eines Blots mit den Antikörpern X4 und S5 von Gelen wie in d. i zeigt einen Blot mit dem P11-Antikörper von einem Gel wie h. Die Bedeutung der Nummern ist aus Tabelle 3 ersichtlich. Die Intensität der numerierten Spots wurde durch computerisierte Messung von Negativen der Gelphotographien ermittelt.

deshalb nicht analysiert werden.

Nach Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose durch einen bidirektionalen Transfer - man erhält also zwei Kopien des Gels (Bowen et al., 1980) - wurde eine Kopie mit Amidoschwarz angefärbt (Abb.19c) und die andere mit dem Antikörper und anschließend mit ^{125}J-markiertem RAM-fab-Antikörper inkubiert. Abb.19e zeigt, daß der X4-Antikörper z.B. nur mit einem Polypeptidspot reagiert. Vergleich mit der mit Amidoschwarz angefärbten Kopie desselben Gels und danach mit einem Gel selbst zeigt, daß das Antigen ein in ca. $1{,}4 \times 10^5$ Kopien pro Zelle vorkommendes Polypeptid ist (Kennzeichnung: Nr. 12). Abb.19f zeigt eine Analyse des S5-Antigens (Nr. 13).

Abb.19h,i stellt die Auftrennung von Eichproteinen (g) bzw. von Kern- und Eichproteinen (h) nach NEPHGE-Fokussierung und SDS-Gelelektrophorese dar. Abb.19i zeigt den Western Blot eines solchen Gels mit dem P11-Antikörper.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

i) Die isoelektrischen Punkte und die Heterogenität der Punkte stimmen weitgehend mit den durch die Fokussierungsgele allein erhaltenen Ergebnissen (s.Abb.6 und Tabelle 2) überein.

ii) Eine eindeutige Zuordnung der Antigene zu Proteinspots ist in vielen Fällen schwierig wegen der Seltenheit der Antigene und der unterschiedlichen Behandlung der beiden Nitrozellulosekopien. Die Ergebnisse wurden aber durch Ausschneiden der Antigenspots und benachbarter Kontrollspots und nochmaliger SDS-Gelelektrophorese und Western Blot (für P11 und S5) bestätigt (nicht ge-

Tabelle 3: Quantifizierung der Antigenmenge

Proteinspot	Art des Proteins	Gesamtintensität (willkürl.Einh.) Äquilib.	NEPHGE Gele	Protein ug	Nach Eichg. durch Eichprotein Nr.	Kopienzahl pro Kern
1	BSA Eichprotein	10,5	-	1,25	-	-
2	CA Eichprotein	8	-	1,25	-	-
3	PGK Eichprotein	-	15	1,25	-	-
4	Trypsininhibitor Eichprotein	4	-	1,25	-	-
5	Kernprotein	15	-	1,8	1	2×10^5-1×10^6
6	"	16,3	-	1,9	1	$2{,}5 \times 10^5$-$1{,}3 \times 10^6$
7	"	10,7	-	1,3	1	2×10^5-1×10^6
8	"	2,3	-	0,3	1	6×10^4-3×10^5
9	"	1,4	-	0,2	1	5×10^4-$2{,}7 \times 10^5$
10	"	10,5	-	1,25	1	$3{,}3 \times 10^5$-$1{,}7 \times 10^6$
11	"	1,5	-	0,2	1	$6{,}4 \times 10^4$-$3{,}2 \times 10^5$
12	X4-Antigen	5,8	-	0,7	1	$5{,}6 \times 10^4$-$2{,}8 \times 10^5$
13	S5-Antigen	21	-	2,5	1	$2{,}9 \times 10^5$-$1{,}4 \times 10^6$
14	P11-Antigen	-	1,7	0,14	3	$3{,}7 \times 10^4$-$1{,}8 \times 10^5$
15	54000D hnRNP Verp.Protein	-	21,9	1,8	3	$3{,}3 \times 10^5$-$1{,}7 \times 10^6$

zeigt). Die Markierung der Proteine mit radioaktiv markierten Aminosäuren zur Kontrolle der erhaltenen Ergebnisse steht noch aus, vor allem deshalb, weil die Kulturzellen diese Aminosäuren schlecht aufnehmen.

iii) Im Falle von X4 und S5 bleibt einiges Antigenmaterial am Gelauftragspunkt liegen. Dieser Anteil läßt sich durch quantitative Auswertung der Autoradiographien auf ungefähr 60 % (X4) und 14 % (S5) schätzen. Wesentlich weniger Material präzipitiert bei der NEPHGE-Fokussierung (vgl. Markerprotein-Intensität ≙ 100 % (PGK) im Gel, und es bleibt auch kein Antigenmaterial am Auftragspunkt liegen.

Zur quantitativen Bestimmung wurden alle mit Nummern gekennzeichneten Polypeptide herangezogen. Tabelle 3 gibt an, um welche es sich handelt.

Um zu testen, ob die Anfärbbarkeit der Proteine proportional ihrer Menge ist, wurden die Eichproteine 1,2,4 in SDS-Gelen in verschiedenen Konzentrationen aufgetrennt und nach quantitativer Auswertung eine Eichkurve aufgenommen. Abb.20a zeigt das entsprechende Gel, Abb.20b die graphische Darstellung.

Auf die computerisierte Auswertung sowohl dieser Eichkurve als auch der Proteinspots der zweidimensionalen Gele soll hier nicht weiter eingegangen werden. Diese Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit R.Burberg und B.Stolze, die auch das Programm geschrieben haben, durchgeführt.

Da die Färbungsintensität eines Proteins im Bereich von 0,1-2ug Protein linear ist, konnte aus den Intensitäten der

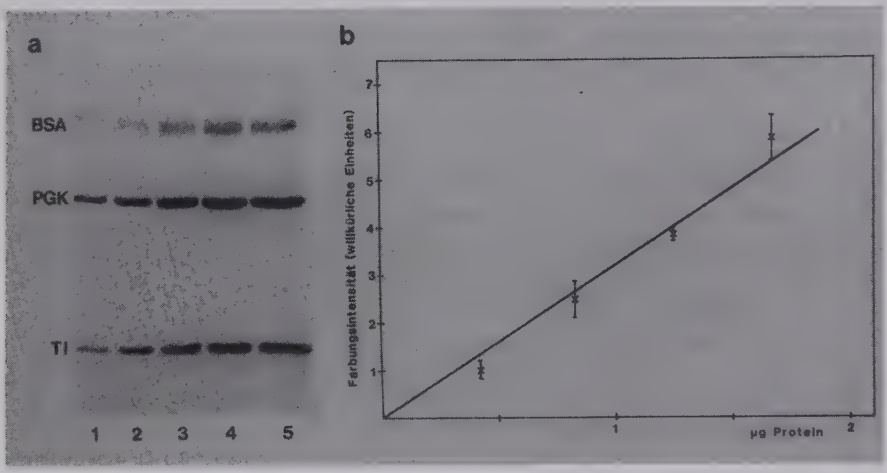


Abb. 20: Abhängigkeit der Färbungsintensität von der Proteinmenge
a zeigt die Auftrennung verschiedener Mengen (Bahn 1-5: =0,42-2,lug) dreier Eichproteinen (Rinderserumalbumin (BSA), Phosphoglyceratkinase (PGK) und Trypsininhibitor (TI) in einem SDS-Gel (12,5%). (Coomassie-Färbung).
b zeigt als Beispiel die für Rinderserumalbumin erhaltene Eichkurve nach Auswertung der Gesamtintensität der Banden. Die Ergebnisse zweier Auswertungen wurden gemittelt. PGK wird um ungefähr einen Faktor 5 besser angefärbt als TI bzw. Carboanhydrase (s.Tabelle 3). Der Sättigungsbereich der Färbung liegt bei ca. 2ug Protein.

Kernproteine und Antigene in den 2D-Gelen direkt die entsprechende Menge (ug) Protein ausgerechnet werden. Die Kopienzahl pro Kc-Zellkern ergab sich dann aus der aufgetragenen Menge der Kerne (s.Abb.19) und dem Molekulargewicht des Proteins. Bezieht man die unterschiedliche Menge des präzipitierten Materials der X4- (60 %) und S5 (14 %) Antigene in die Berechnung ein, so ergibt sich für X4 eine Kopienzahl von ca. $3{,}5 \times 10^5$ und für S5 von ca. 8×10^5 pro Kern. Wenn man annimmt, daß 50 % der Menge des zur Eichung

herangezogenen Proteins (BSA) präzipitiert, halbieren sich diese Zahlen.

Fehlerquellen dieser Analyse wurden bereits angesprochen, nämlich die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Proteine (ungefähr Faktor 5, s. Abb.20 und Tabelle 3) und die unterschiedliche Menge präzipitierten Materials verschiedener Proteine. Weiterhin ist anzunehmen, daß das Auftreten verschiedener zu einem Polypeptid gehörender Flecken gleichen Molekülargewichts (z.B. S5-Antigen) zu Fehlern bei der Quantifizierung führen könnte. Der immunologische Nachweis bietet aber den Vorteil, entscheiden zu können, welche Flecken zu einem bestimmten Protein gehören und wie groß die präzipitierte Menge ist.

Klare Aussagen lassen sich für das P11-Antigen machen, weil kein Antigen präzipitiert (nach NEPHGE-Fokussierung) und die Antigenflecken eindeutig identifiziert werden konnten.

c) Ionische Protein-RNS Wechselwirkungen in hnRNP-Strukturen

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens zwischen hnRNS und den assoziierten Proteinen ist bei anderen Organismen oft die salzabhängige Dissoziation der Proteine von der RNS herangezogen worden. Beyer et al. (1977) konnten z.B. zeigen, daß die Verpackungsproteine von HeLa-RNP-Partikeln unterschiedlich sensitiv gegen eine Erhöhung der Salzkonzentration sind. Gallinaro-Matringe et al. (1975) wiesen an großen hnRNP-Strukturen nach, daß besonders die in geringer Menge vorkommenden und mit hnRNS kosedimentierenden Polypep-

tide nur schwache ionische Wechselwirkungen mit hnRNP eingehen. Qualitativ das gleiche Ergebnis wurde, wie in Abb.16 gezeigt, für Drosophila hnRNP-Strukturen gefunden. Eine genaue Analyse einzelner Polypeptide ist jedoch kaum möglich, jedenfalls nicht für Proteine geringer Häufigkeit. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen diese Proteine kann die Salzabhängigkeit der Dissoziation dieser Proteine mit hnRNS bzw. mit der Partikelstruktur, mit der sie unter physiologischen Bedingungen assoziiert sind, genau analysiert werden (Abb.21).

Abb.21h zeigt, daß pulsmarkierte RNS-enthaltende Strukturen mit der Erhöhung der Salzkonzentration von 100 auf 300 mM sukzessive langsamer sedimentieren (von 70-150S auf 30-80S). Die Verteilung bleibt jedoch heterodispers.

Die Antigene verhalten sich aber sehr unterschiedlich. Das einzige Antigen, das bis zu 300mM Salz noch mit der hnRNS kosedimentiert, ist das P46-Antigen (c). Das X4-Antigen ist noch bei 200 mM Salz mit der hnRNS assoziiert (a), während man bei dieser Ionenstärke nur noch sehr wenig S5-Antigen in größeren Partikeln findet (b). Die ohnehin vorwiegend in kleinen Partikeln vorkommenden Antigene Q18 und V4 (f,g) dissoziieren schon bei 150mM Salz, ähnlich wie die P11- und T7-Antigen enthaltenden Strukturen (d,e).

Die Antigene X4, S5, P11 und T7 ändern ihre Verteilung bei 50mM Salz nicht im Vergleich zu 100mM Salz (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Antigene unterschiedlich starke ionische Wechselwirkungen mit der hnRNS bzw. hnRNP-Strukturen besitzen und daß keines der

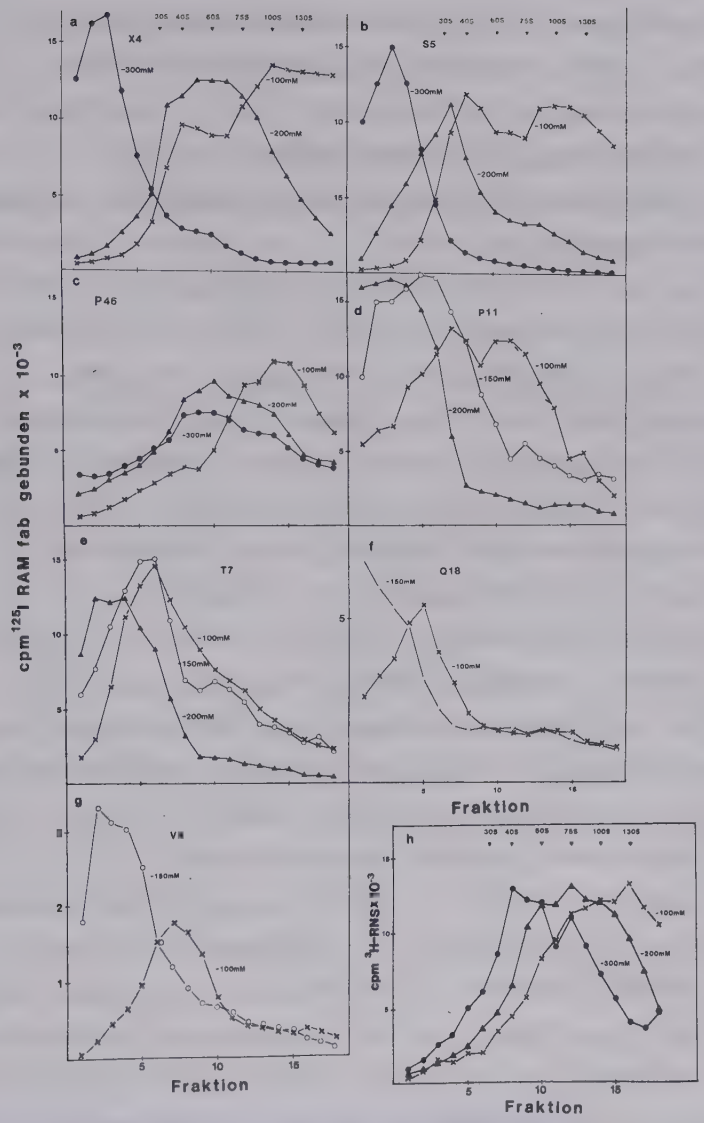


Abb. 21: Antigenverteilung in Sucrosegradienten: Salzabhängigkeit

Jeweils 1ml des hnRNP-Extraktes wurde auf eine entspechende Konzentration an NaCl (s.Kurven) eingestellt und in Sucrosegradienten entsprechenden Salzgehaltes aufgetrennt unter Standardbedingungen (s. Abb.8). a-g: Verteilung der Antigene. h: Verteilung der RNS.

Antigene (außer P46) für die Aufrechterhaltung der verpackten Struktur der hnRNS verantwortlich sein kann.

IV. Heterogenität von hnRNP-Strukturen

1. Variabilität der Verteilung der Antigene in Sucrosegradienten

Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, daß die untersuchten Antigene X4, S5, P46, P11, T7 und eventuell Q18 und V4 mit hnRNS assoziiert, aber nicht selbst Verpackungsproteine sind. Diese Proteine, die also wahrscheinlich am Processing im weitesten Sinne (s. Diskussion) beteiligt sind, zeigen außerdem eine differentielle Verteilung in Sucrosegradienten. Die Frage ist, ob die differentielle Verteilung (bzw. die Einteilung in 3 Gruppen, s.II,2) mit der Funktion des Antigens korreliert oder ob es sich einfach um Isolierungsartefakte handelt. Die Reproduzierbarkeit (s.auch Abb. 24-26 und Diskussion) der Verteilung des jeweiligen Antigens in Sucrosegradienten unter Standardbedingungen, die in Abb.22a-d noch einmal gezeigt ist, läßt letztere Möglichkeit wenig wahrscheinlich erscheinen.

Unter der Annahme, daß die Verteilung der Antigene die echten Antigen-hnRNS-Verhältnisse widerspiegelt, kann man auf eine Heterogenität von hnRNP-Partikeln schließen. Nimmt man nämlich die höchste im RIA gebundene Menge der beteiligten Antikörper als 100 % an, so würde z.B. ein 130S-Partikel wesentlich mehr X4- als P11-Antigen enthalten und ein 75S-Partikel ungefähr gleich viel beider Antigene. Andererseits würde ein 75S-Partikel mehr X4- als T7-Antigen enthalten, ein 40S-Partikel aber ungefähr gleich viel.

Beispiele dieser Art ließen sich leicht mehr finden, jedoch ist die Relevanz dieser Beobachtung erst klar, wenn man nachweisen kann, daß im Gegensatz zu den Verpackungsproteinen der hnRNS, die relativ homogen auf allen Sequenzen verteilt sein sollten, die untersuchten Antigene nur mit ganz bestimmten Sequenzen, die auch nur in ganz bestimmten Partikeln vorhanden sind, assoziiert sind.

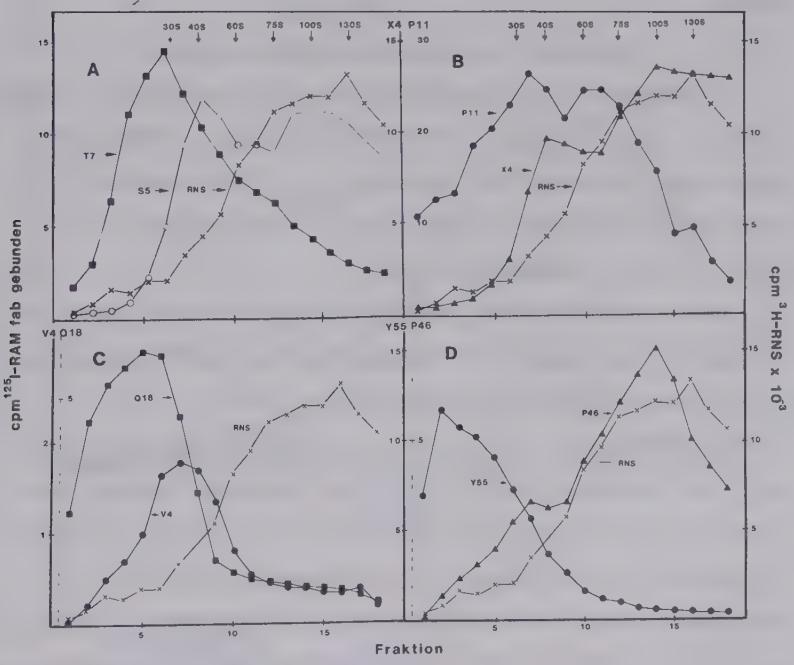


Abb. 22: Antigenverteilung in Sucrosegradienten
Zum genaueren Vergleich des Vorkommens der Antigene in hnRNP-Komplexen wurde die bereits in Abb.8 gezeigte Verteilung der Antigene unter Standardbedingungen noch einmal zusammengefaßt.

Ein anderer Nachweis wäre die von der Verpackung der hnRNS und voneinander unabhängige Assoziation der Antigene mit (oder Dissoziation von) der RNS unter bestimmten, wenn möglich physiologischen Bedingungen. Nachfolgend sollen zwei Experimente beschrieben werden, in denen sich zeigte, daß sowohl die Anwesenheit oder Abwesenheit von zweiwertigen Ionen als auch die Veränderung des Genaktivitätsmusters der Zelle das Sedimentationsverhalten mancher Antigene ändern konnten.

a) Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen

Zur einfachen Unterscheidung von polysomalen und hnRNP-Komplexen wurde oft die Dissoziierbarkeit der ribosomalen Untereinheiten durch EDTA herangezogen (z.B. Thomas et al., 1981). HnRNP-Komplexe bleiben unter diesen Bedingungen stabil (s. z.B. Pederson, 1974).

Abb.23 und 24 zeigen die Verteilung pulsmarkierter RNS bzw. der Antigene nach EDTA-Behandlung des hnRNP-Extraktes und Analyse in EDTA-Sucrosegradienten.

Die Änderung im Sedimentationsverhalten der Antigene X4, S5 und P46 (Abb.24a-d) korreliert mit der Änderung der Verteilung der pulsmarkierten RNS (Abb.23). Diese Antigene und die RNS sedimentieren nach EDTA-Behandlung ein wenig schneller im Vergleich zur Kontrolle (1,5 mM $MgCl_2$). Größere Veränderungen im Sedimentationsverhalten zeigen die Antigene P11, T7, Q18 und V4 (Abb.24d-g). Die Verschiebung der Verteilung dieser Antigene, die im Gegensatz zu den oben genannten Antigenen hauptsächlich in kleinen Partikeln vorkommen, zu größeren Komplexen hin ist viel größer. Eine

mögliche Interpretation dieser Verschiebung wird in der Diskussion (S.100) angeboten.

Die Sedimentation des Y55-Antigens ist unbeeinflußt durch EDTA.

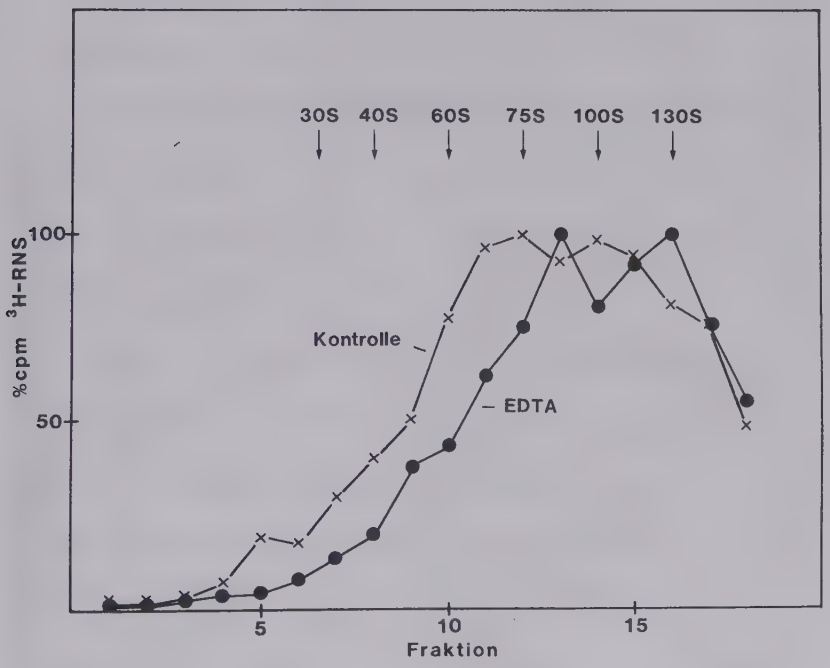


Abb. 23: Verteilung der pulsmarkierten RNS nach EDTA-Behandlung
Je 1ml des hnRNP-Extraktes wurde mit bzw. ohne Zusatz von 10mM EDTA (pH 8,0) in Sucrosegradienten (in TMN bzw. TEN-Puffer, s. Material und Methoden) aufgetrennt und die Verteilung der pulsmarkierten RNS getestet.

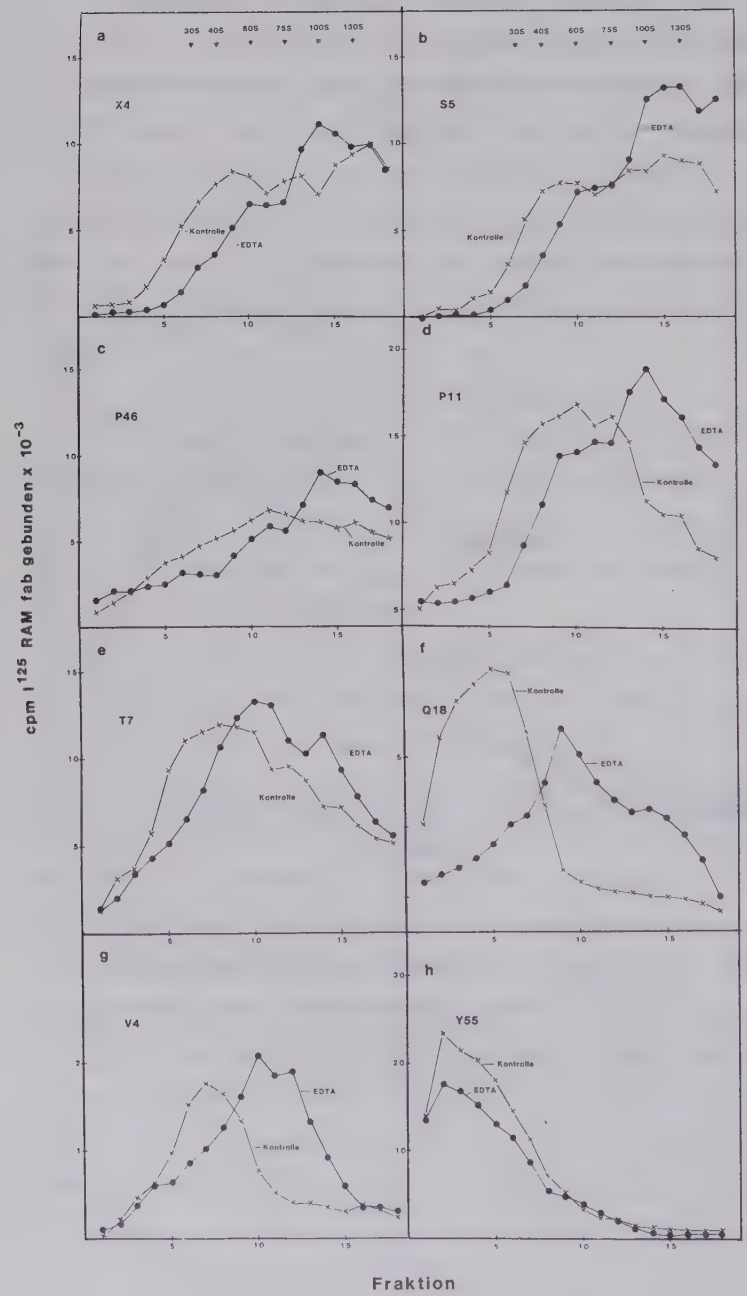


Abb. 24: Antigenverteilung in Sucrosegradienten: EDTA-Abhängigkeit
Dieselben Gradienten wie in Abb.23 wurden auf Antigengehalt analysiert.

b) Hitzeschock

Eine weitere Änderung der Zusammensetzung bzw. des Sedimentationsverhaltens von hnRNS enthaltenden Komplexen könnte sich ergeben, wenn sich die Genaktivität einer Zelle plötzlich ändert. Eine solche Änderung kann in Drosophila (u.a. Organismen) leicht durch eine Erhöhung der Temperatur (Hitzeschock) induziert werden, sowohl bei Zellkulturzellen als auch bei den Tieren selbst (Überblick bei Ashburner and Bonner, 1979). In polytänen Chromosomen wird dann die Transkription der vor diesem Zeitpunkt aktiven Gene gestoppt, und eine Gruppe von ungefähr 9 neuen Genen (bzw. Puffs in polytänen Chromosomen) wird transkriptionsaktiv. In Abb.27 sind 2 dieser Loci gekennzeichnet.

Führt man ein derartiges Hitzeschock-Experiment mit Drosophila-Kc-Zellen durch, isoliert die hnRNP-Komplexe und analysiert sie in Sucrosegradienten, so erhält man die in Abb.25 und 26 gezeigten Ergebnisse. Sie resultierten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. In Abb.25 sind die Ergebnisse des einen Experimentes als Mengenvergleich dargestellt, in Abb.26 die des anderen Experimentes als prozentualer Vergleich. Beide Experimente liefern Ergebnisse, die folgendermaßen zusammengefaßt werden können:

- Die Menge der pulsmarkierten RNS ist unter Hitzeschockbedingungen wesentlich geringer (Abb.25e, 26f), ist aber in ähnlich großen Komplexen vorhanden wie unter Normalbedingungen transkribierte RNS.
- Im Durchschnitt wird weniger Antigen unter Hitzeschockbedingungen extrahiert. Dieser Effekt ist am

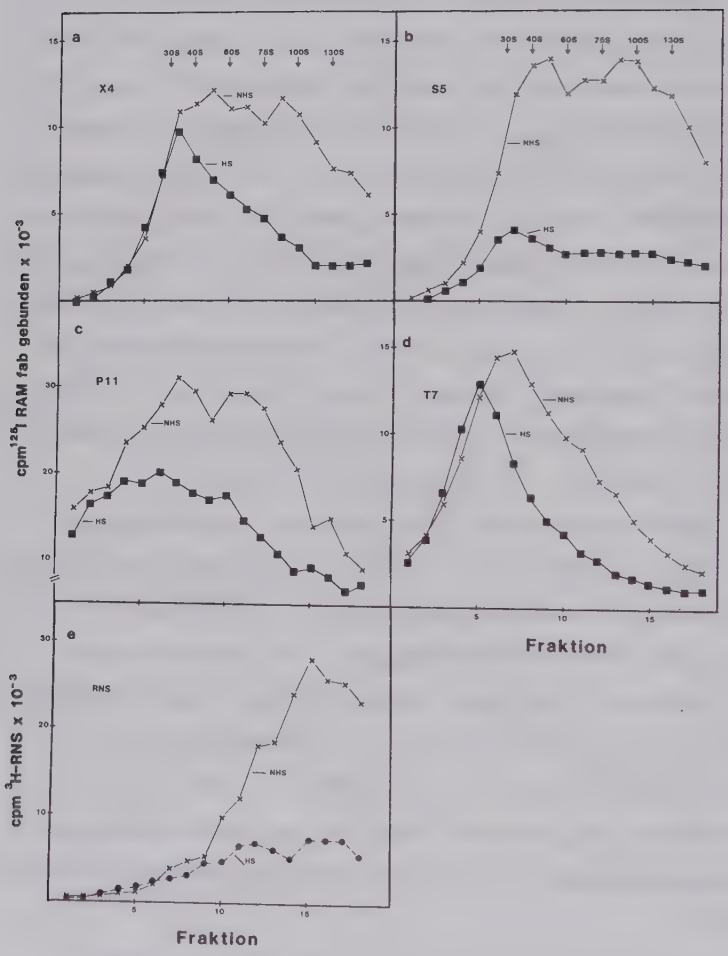


Abb. 25: Antigenverteilung in Sucrosegradienten nach Hitzeschock

Der hnRNP-Extrakt wurde aus Zellen, die bei 25°C (NHS) und 37°C (HS: Hitzeschock) inkubiert worden waren, isoliert, auf Sucrosegradienten aufgetrennt und die Verteilung der Antigene analysiert. Die Menge ^{125}J RAMfab gebunden wurde aufgetragen (a-d).

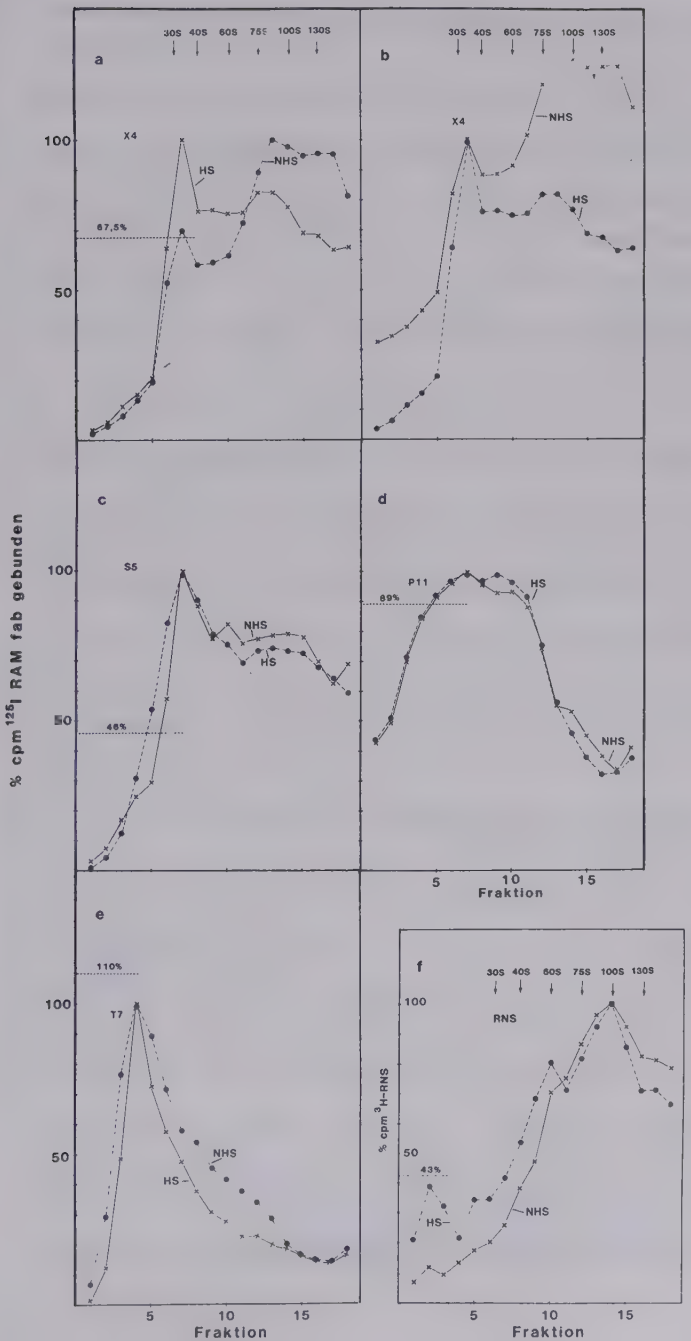


Abb. 26: Antigenverteilung in Sucrosegradienten nach Hitzeschock
Durchführung wie in Abb.25 beschrieben. Der Prozentsatz ^{125}J RAMfab gebunden (im Maximum) bzw. der Prozentsatz der ^{3}H-RNS (f) wurde aufgetragen. Die in den Figuren angegebenen Prozentzahlen sind ausgerechnet aus der maximalen Menge ^{125}J RAMfab gebunden im HS, verglichen mit NHS (100 %).

größten beim S5-Antigen, geringer bei den P11- und T7-Antigenen.

- Die Verteilung im Sucrosegradienten der Antigene P11 und S5 wird nur geringfügig beeinflußt. Das T7-Antigen zeigt eine Verschiebung der Verteilung zu kleineren Partikeln hin. Diese Verschiebung ist stärker ausgeprägt in Abb.25d als in Abb. 26e.
- Einen großen Einfluß übt ein Hitzeschock auf die Verteilung des X4-Antigens aus (Abb.25a, 26a und b). Das Antigen ist nach Hitzeschock nur noch in kleineren Partikeln (30-40S) zu finden. In Abb.26a und b ist zum Vergleich einmal eine Normalisierung auf 100% in der Fraktion des größten Vorkommens des Antigens (a), durch die die Verschiebung deutlich wird, bzw. die Normalisierung auf 100 % in den Fraktionen der kleinen Partikel (b), durch die die unterschiedliche Menge des X4-Antigens in den größeren Partikeln deutlich wird.

2. Direkte und indirekte Immunfluoreszenz auf polytänen Chromosomen

Da durch die bisher durchgeführten Versuche klar war, daß die Antigene, die nicht die Verpackungsproteine der hnRNS sind, mit hnRNS weitgehend unabhängig voneinander assoziieren können und man eine Heterogenität der hnRNP-Partikel in bezug auf ihre Antigen-Zusammensetzung feststellen konnte, war die Frage, ob man diese Beobachtungen mit cytologischen Daten korrelieren konnte bzw. zusätzliche Informationen gewinnen konnte.

Alle Antigene kommen auf polytänen Chromosomen in fast

allen Puffs und vielen Interbanden vor. Diese Verteilung ist bei genauer Analyse sehr ähnlich (Saumweber et al., 1980; Kabisch, 1982; Rudolf Burberg, unveröffentlicht), ist aber verschieden von der RNS-Polymerase II-Verteilung. Unterschiede in der Verteilung der Antigene können zumeist auf das unterschiedliche Alter der Larven bzw. die durch Ecdyson induzierte Transkriptions- und Puffmusteränderungen während der Entwicklung zurückgeführt werden (Ashburner, 1972; Kabisch, 1982; Risau et al., 1983). Zur genaueren Analyse wurde deswegen in unserer Arbeitsgruppe versucht, die Immunfluoreszenz von zwei verschiedenen Antikörpern nach Direktmarkierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen auf demselben Chromosom quantitativ auszuwerten. Dadurch sollte es möglich sein, die unterschiedliche quantitative Verteilung verschiedener Antigene auf der Ebene einzelner Transkriptionseinheiten zu analysieren. Da die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse bereits zur Veröffentlichung eingereicht sind (Risau et al., 1983), sollen sie hier nur kurz zusammengefaßt werden: Die Antigene X4 und S5 zeigen auf etwa 75 % der analysierten Stellen auf polytänen Chromosomen (Puffs und Interbanden) eine quantitativ gleiche Verteilung, auf 25 % der Stellen kleine Unterschiede. In etwa 1 % der Fälle kann man sogar qualitative Unterschiede feststellen (X4 anwesend in einem Puff, S5 nicht). Pl1 ist ebenfalls in den meisten Fällen gleich wie S5, T7 zeigt jedoch in allen Fällen große Unterschiede. Alle anderen Antigene sind bislang mit dieser Methode nicht untersucht worden, jedoch sind besonders bei der Analyse des V4-Antigens Unterschiede zu erwarten (Saumweber et al., 1980;

Kabisch, 1982).

Qualitative Unterschiede in der Verteilung der Antigene auf polytänen Chromosomen lassen sich besonders augenfällig demonstrieren, wenn man ein Hitzeschock-Experiment durchführt. Wie bereits erwähnt (s. IV, 1), werden neue Puffs auf polytänen Chromosomen induziert, während die Synthese der unter Normalbedingungen hergestellten mRNS gestoppt wird. Abb. 27 zeigt die Verteilung der Q18- und P46-Antigene auf polytänen Chromosomen nach einem Hitzeschock. Beide Antigene sind nach Hitzeschock hauptsächlich im Puff 93D lokalisiert.

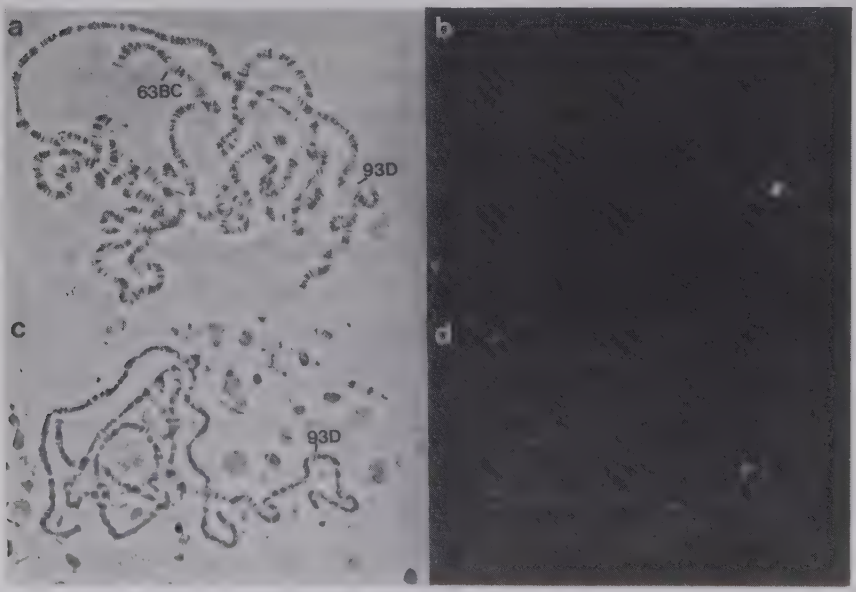


Abb. 27: Verteilung der Antigene auf polytänen Chromosomen nach Hitzeschock
Drosophila-Larven wurden 30 min bei 37°C inkubiert, die Speicheldrüsen wurden isoliert, und es wurde ein Quetschpräparat der polytänen Chromosomen hergestellt. a und c Phasenkontrast, b und d indirekte Immunfluoreszenz und nach Anfärbung mit dem Q18- (b) und P46-Antikörper (d). Die gekennzeichneten Loci (93D und 63 BC) sind Hitzeschockpuffs (s. Ashburner and Bonner, 1979)

3. Verteilung der Antigene im Zellkern

Weitere zytologische Daten lassen sich mit Hilfe der Immunfluoreszenz an intakten Kc-Zellen und Speicheldrüsen-

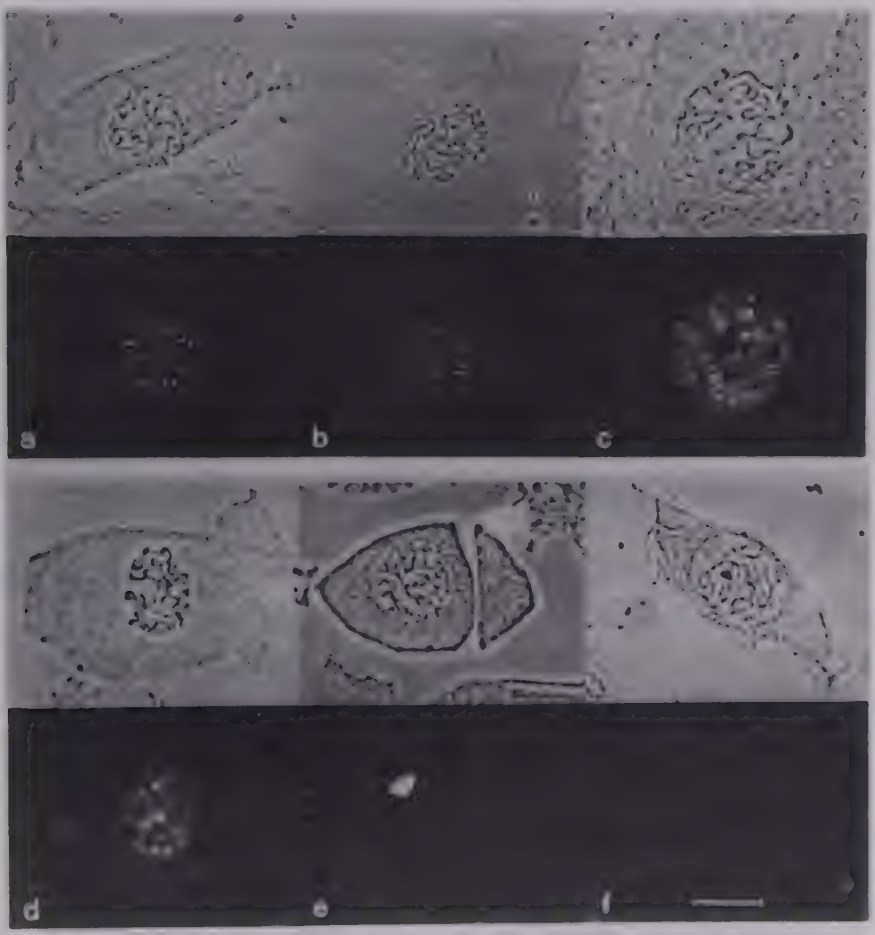


Abb. 28: Verteilung der Antigene in Speicheldrüsenzellen
Quetschpräparate von Speicheldrüsen von Drosophila-Larven wurden mit den Antikörpern S5 (a), P11 (b), P46 (c), T7 (d), Aj1 (e) und P3 (f) in der indirekten Immunfluoreszenz angefärbt.

zellen gewinnen. Diese Methode erlaubt die Feststellung, daß alle untersuchten Antigene ausschließlich im Zellkern vorkommen. Abb. 28 zeigt als Beispiel die Immunfluoreszenz der S5-, P11-, P46 und T7-Antigene, die sich auf den Zellkern bzw. die polytänen Chromosomen beschränkt. Als Kontrolle wurde der P3-Antikörper benutzt (wird von P3-X63-Ag8 Myelomzellen synthetisiert) und der Ajl-Antikörper, der den Nukleolus spezifisch anfärbt.

Es gibt aber offensichtlich Unterschiede in der Verteilung der Antigene im Zellkern. Während die S5- und P11-Antigene ausschließlich auf dem Chromosom lokalisiert sind, färben die P46- und T7-Antikörper auch Bereiche um die Chromosomen herum (Nukleoplasma?) an.

V. Isolierung von RNS-Proteinkomplexen durch Affinitätsmatrices

1. Optimierung

Die Immunaffinitätschromatographie ist eine vorteilhafte Methode, um in einem Reaktionsschritt und hochspezifisch Antigene zu isolieren. Standard-Affinitätsmatrices bestehen aus kovalent an Cyanbromid-aktivierte Sepharose gekoppelten gereinigten Antikörpern. Nachteilig kann sich dabei eine Inaktivierung des Antikörpers durch die kovalente Fixierung der für die Antigen-Antikörper-Reaktion wichtigen Molekülgruppen an die Matrix bemerkbar machen. Dies mag in besonderem Maße für monoklonale und unter diesen wiederum für schwach bindende (schwach affine) Antikörper (s. z.B. Claviez et al., 1982) zutreffen. Indirekte Methoden, z.B. die

Bindung des Antikörpers an eine Antiantikörpermatrix, werden deshalb häufig vorgezogen (s. z.B. Schneider et al., 1982) und können außerdem als gleiche Matrix für verschiedene Antikörper verwendet werden. Protein A-Sepharose anstelle von Antiantikörper bietet darüber hinaus den Vorteil, nur den fc-Teil von Immunglobulinen zu binden (Überblick siehe Langone, 1982), also den antigenbindenden Teil freizulassen. Protein A reagiert aber leider nicht sehr gut mit der Subklasse 1 der Gammaglobuline der Maus (s. Ey et al., 1978), der die meisten der untersuchten monoklonalen Antikörper (s. Tabelle 2) angehören.

a) Bindung von monoklonalen Antikörpern an verschiedene Affinitätsmatrices

Zur Optimierung war es daher ratsam, Antiantikörper-Matrices und Protein A-Sepharose zu vergleichen. Steigende Mengen verschiedener gereinigter monoklonaler Antikörper wurden deshalb über einen gewissen Zeitraum mit einer bestimmten Menge Kaninchen-anti-Mausfc-Sepharose (RAMfc; siehe Methoden) bzw. Protein A-Sepharose (Pharmacia) inkubiert. Die gebundene Menge Antikörper wurde nach Abzentrifugation der Matrix durch die Bestimmung im Überstand verbliebenen Antikörpers (s. IgG-Bestimmung) ausgerechnet. Im Hinblick auf spätere Versuche wurden gleiche Mengen an hnRNP-Extrakt mitinkubiert. Unspezifische Bindung von Antikörper an Sepharose 4B wurde gleichermaßen ausgetestet, betrug aber höchstens 10% der spezifischen Bindung und wurde deshalb bei der Auswertung vernachlässigt.

Abb.29a zeigt, daß 15µg an Sepharose gekoppelter RAMfc-Antikörper unter den gegebenen Bedingungen (90min, 4°C,

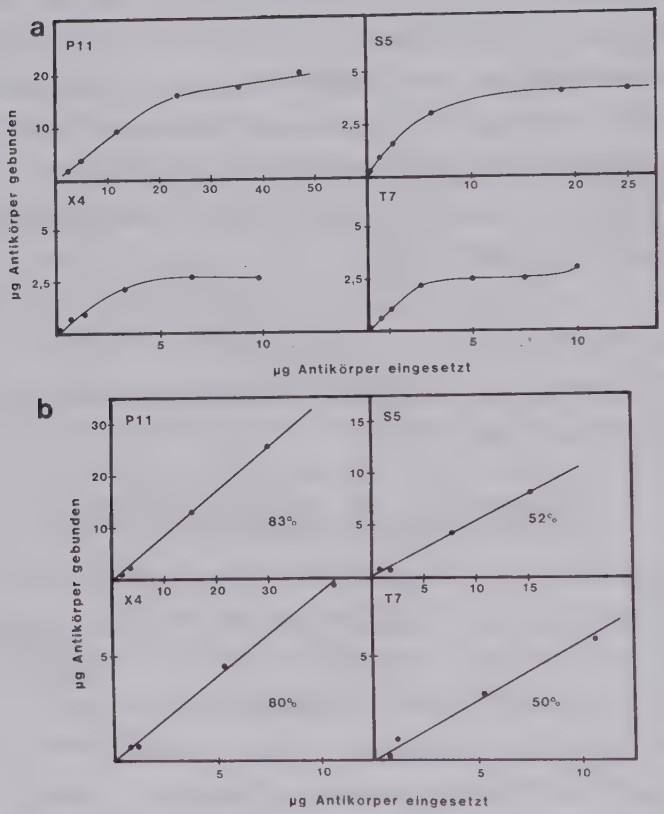


Abb. 29: Bindung von monoklonalen Antikörpern an RAMfc- und Protein A-Sepharose
Die Abhängigkeit der Bindung von monoklonalen Antikörpern von der eingesetzten Antikörpermenge ist in a für RAMfc-Sepharose, in b für Protein A-Sepharose gezeigt. In b ist außerdem die prozentuale Menge des gebundenen Antikörpers angegeben. Zur Auswertung siehe Tabelle 4.

pH8,0) von allen Antikörpern abgesättigt werden kann. Die Sättigungswerte sind jedoch für verschiedene Antikörper unterschiedlich hoch (s. Tabelle 3). Protein A-Sepharose zeigt dagegen unter gleichen Bedingungen keine Sättigung

(Abb.29b). Ein linearer Anstieg in dem Bindungsverhalten von monoklonalen Antikörpern an Protein A-Sepharose ist festzustellen, jedoch werden prozentual unterschiedliche Mengen der verschiedenen Antikörper gebunden. Die Ergebnisse sind noch einmal in Tabelle 4 zusammengefaßt:

Tabelle 4: Bindung von monoklonalen Antikörpern an RAMfc- und Protein A-Sepharose

Antikörper eingesetzt µg	Antikörper	Antikörper von RAMfc-Sepharose* gebunden (RAMgeb) (Sättigung) µg	Antikörper v. Protein A*-Sepharose gebunden (PrAgeb) µg	Faktor: PrAgeb / RAMgeb
30	P11	17,5	25	1,43
15	S5	4	8	2
7,5	T7	2,5	4,3	1,72
7,5	X4	2,5	6	2,4

* 15 µg RAMfc
* 50 µg Protein A

In allen Fällen bindet Protein A-Sepharose mehr Antikörper, ohne Sättigung zu zeigen, als RAMfc-Sepharose. Da theoretisch Protein A aber vier Bindungsstellen für IgG hat, RAMfc aber nur zwei und außerdem viel weniger RAMfc eingesetzt wurde, bindet RAMfc-Sepharose mehr Antikörper als Protein A-Sepharose. Die aufwendige Herstellung würde sich aber nur bei einer Bindungskapazität wie für den P11-Antikörper oder für von Protein A-Sepharose nicht gebundene Antikörper lohnen.

Die in Tabelle 4 aufgeführten Daten lassen vermuten, daß es verschieden gut (an Protein A bzw. RAMfc) bindende Antikörper gibt. Unter den getesteten Antikörpern bindet P11 am besten sowohl an Protein A- als auch an RAMfc-Sepharose. Da der P11-Antikörper aber der einzige IgG2a-Antikörper in dieser Gruppe ist, lassen sich zumindest seine besseren Bindungseigenschaften an Protein A-Sepharose erklären. Weiterhin ist nicht klar, wieviel intakter (bindungsfähiger) Antikörper im Einzelfall überhaupt zur Verfügung stand. Untereinander sind beide Versuche (Protein A und RAMfc) jedoch vergleichbar, weil die gleichen Antikörper verwendet wurden.

Diese Antikörper wurden auch mit RAMfab-Sepharose getestet (nicht gezeigt), die die Antikörper aber nicht besser bindet als RAMfc-Sepharose und wegen der möglichen Beeinflussung der Antigenbindungsstelle nicht weiter verwendet wurde. Längere Inkubationszeiten ergaben keine wesentlichen Verbesserungen der Bindung (nicht gezeigt).

b) Bindung von Antigenen an Antikörper-Affinitätsmatrices

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer der immobilisierten Antikörper mit dem Antigen wurden die P11- und X4-Antikörper an Protein A-Sepharose gebunden (s.o.) und nach Entfernung nicht gebundener Antikörper mit der gleichen Antigenmenge (hnRNP-Extrakt) inkubiert. Nach den in Abb.30 angegebenen Zeiten wurde ein Aliquot entnommen, die Sepharose abzentrifugiert und die Menge des nicht gebundenen Antigens im Überstand im RIA ermittelt. Abb.30 zeigt, daß schon nach einer Stunde ungefähr 50% und nach 4 Stunden

ungefähr 70% (X4) bzw. 90% (P11) der Antigenmenge gebunden wurden.

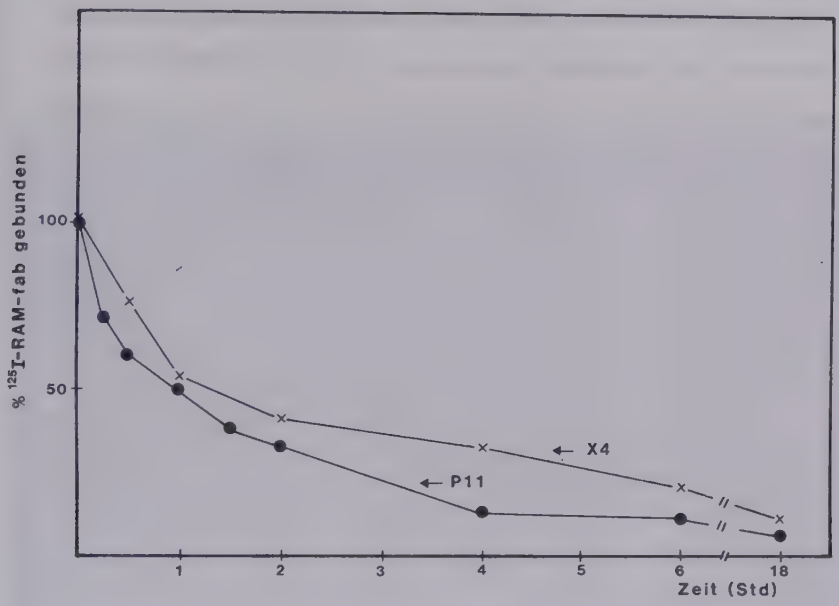


Abb. 30: Bindung von Antigenen an Antikörper-Protein A-Sepharose
HnRNP-Extrakt wurde mit an Protein A-Sepharose gebundenen X4- und P11-Antikörpern inkubiert, zu den angegebenen Zeiten ein Aliquot abgenommen, zentrifugiert und der Überstand im RIA auf Antigengehalt getestet.

Diese Bestimmung ist nur durchführbar, wenn nicht während der Inkubation gebundener Antikörper dissoziiert. Dann nämlich ist der Hintergrundwert viel höher als der eigentliche Meßwert (mehr X4 z.B. an PVC gebunden als an Antigen). In diesem Versuch waren die Hintergrundwerte bei X4 höher als bei P11.

c) Spezifität der Methode

Die Optimierung in a) und b) erfolgte bereits mit dem Ziel, mit dieser Methodik affinitätschromatographisch RNS-Protein- oder allgemein Nukleinsäure-Protein-Komplexe, die bestimmte Antigene enthalten, zu reinigen. Unter der Voraussetzung, daß Antigene an spezifische Nukleinsäuresequenzen binden, sollte es möglich sein, diese Sequenzen "herauszufischen" und außerdem die genaue Zusammensetzung dieser Komplexe zu ermitteln.

Da man es hier mit RNS-Protein-Komplexen zu tun hat, kamen wegen der Ribonuklease-Sensitivität dieser Strukturen (s. II, 3) von vornherein nur kurze Inkubationszeiten bei niedriger Temperatur und pH-Werten von 6-8 in Frage. Wegen der möglicherweise geringen Affinität der Antikörper mußten aber verschiedene Bedingungen und verschiedene Antikörper getestet werden.

Darüber hinaus sollte gewährleistet sein, daß die Methode allgemein anwendbar ist, also nicht nur mit im Großmaßstab gereinigten, nukleasefreien Antikörpern durchführbar ist. Deshalb wurden die Antikörper zuerst an die Matrix gebunden und durch Entfernen nicht gebundenen Materials wahrscheinlich auch nukleasehaltige Verunreinigungen entfernt.

Ein weiteres Problem ist die Unlöslichkeit von Kernproteinen bzw. Protein-Nukleinsäure-Komplexen. Inkubiert man z.B. Chromatin oder den hnRNP-Extrakt über Nacht bei $4^{o}C$ unter Schütteln, so bilden sich (evtl. durch Oxidation) schwerlösliche Aggregate, die die Sepharose nach der Zentrifugation verunreinigen. Eine Lösung des Problems besteht

darin, nur kurz zu inkubieren (unter Antikörper-Überschuß), nicht zu kräftig zu schütteln und nach der Inkubation die Sepharose durch ein 45%iges Sucrosekissen zu zentrifugieren (s. Methoden).

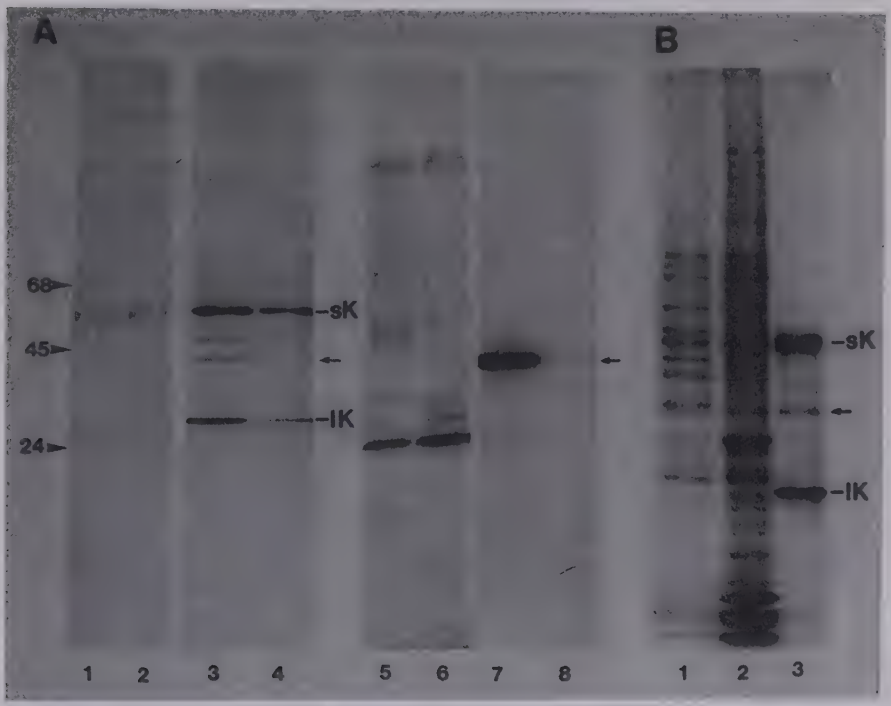


Abb. 31: Spezifität der Immunpräzipitation mit P11-Protein A-Sepharose

A: Die Fraktionen 3-9 (vorderer Teil) und 10-18 (hinterer Teil) eines Sucrosegradienten wurden gesammelt, mit dem Bolton-Hunter-Reagent mit ^{125}J markiert und mit P11-Protein A-Sepharose inkubiert. Bahn 1 und 5 zeigen die Proteine des vorderen Teils, Bahn 2 und 6 die des hinteren Teils nach Auftrennung auf 10-17%igen SDS-Gelen. Bahn 3 und 7 bzw. 4 und 8 zeigen die an P11-Protein A-Sepharose gebundenen Proteine des vorderen bzw. hinteren Teils (Bahn 1-4: Coomassie-Färbung, Bahn 5-8: Autoradiographie.

B: Gesamtkernproteine (Bahn 2) wurden mit P11-Protein A-Sepharose (in 0,5M NaCl, 0,1% Triton) inkubiert und gebundenes Protein auf SDS-Gelen (10-17%) analysiert (Coomassie-Färbung). sK: schwere Kette des P11-Antikörpers. lK: leichte Kette des P11-Antikörpers. Pfeil: P11-Antigen, Markerproteine s. Abb.7.

Solchermaßen optimierte Methoden wurden angewandt, um die Spezifität der Methode zu prüfen. Unter dissoziierenden Bedingungen dürfte nur das Antigen von der Antikörper-Protein A-Sepharose gebunden werden. Abb.31a zeigt das Ergebnis eines Versuches, bei dem die Proteine aus dem vorderen bzw. hinteren Teil des Sucrosegradienten (Bahn 1 bzw. 2) in vitro radioaktiv markiert wurden (Bahn 5 bzw. 6), dann mit P11-Protein A-Sepharose inkubiert wurden und das an den immobilisierten Antikörper gebundene Protein auf SDS-Gelen analysiert wurde (Bahn 3 und 4) oder autoradiographisch nachgewiesen wurde (Bahn 7 und 8). Ein Polypeptid mit dem Molekulargewicht des P11-Antigens (Pfeil) ist spezifisch vor allem aus dem vorderen Teil des Gradienten (unter 150mM Salz, s. Abb. 21) isoliert worden.

Diese Methode ist sogar auf Gesamtkernproteine anwendbar. Abb.31b zeigt die Proteine des hnRNP-Extraktes (Bahn 1) im Vergleich zu Gesamtkernproteinen (Bahn 2), aus denen spezifisch das P11-Antigen (Bahn 3, Pfeil) "herausgefischt" wurde. Durch nachfolgenden Western Blot kann man nachweisen, daß es sich tatsächlich um das P11-Antigen handelt (nicht gezeigt, s. auch Abb.32). In Kontrollversuchen mit Maus-IgG wurden keine spezifischen Proteinbanden erhalten (s. Abb. 32).

2. Protein-Protein-Wechselwirkung in hnRNP-Komplexen

Eine mögliche Anwendung dieser Methode bestünde darin, die Proteinzusammensetzung in antigenenthaltenden Komplexen zu studieren. So könnte man fragen, ob das X4-Antigen, das ja ähnlich sedimentiert mit hnRNP-Komplexen wie das S5-

Antigen, mit diesem in einem Komplex vorkommt. Die Immunfluoreszenz-Ergebnisse haben bereits gezeigt, daß sie gemeinsam in den gleichen Puffs und Interbanden vorkommen, und die quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz hat darüber hinaus eine strenge Korrelation ihres gemeinsamen Auftretens wie auch das der anderen Antigene in transkriptionsaktiven Bereichen erbracht (s. IV, 2).

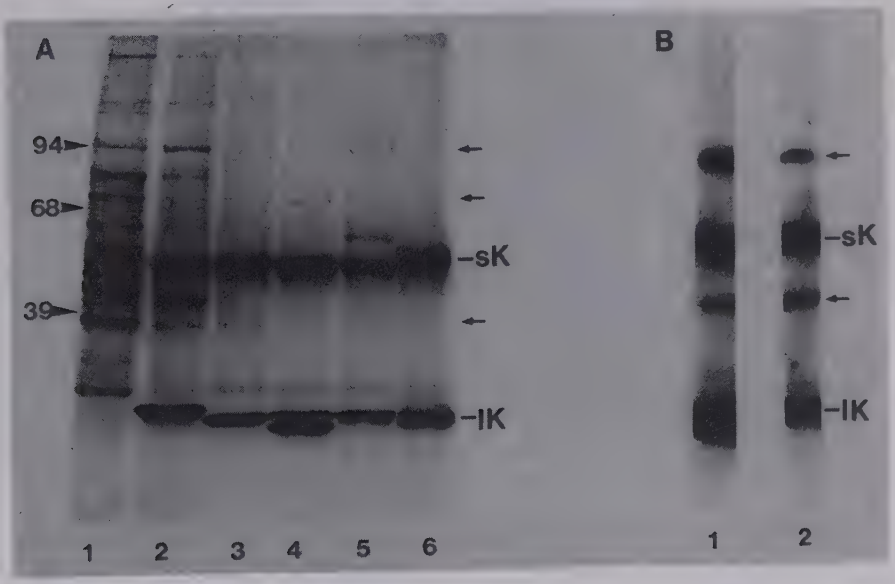


Abb. 32: Protein-Protein-Wechselwirkung in hnRNP-Komplexen
A: Der hnRNP-Extrakt (Bahn 1) wurde mit den an ProteinA-Sepharose gebundenen Antikörpern (Bahn 2-6: P11, T7, S5, X4, Maus-IgG) inkubiert und die gebundenen Proteine auf SDS-Gelen (12,5%) analysiert (Coomassie-Färbung).
B: Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitate der S5-(Bahn 1) und X4- (Bahn 2) Antikörper nach gemeinsamer Inkubation mit S5- und P11-Antikörper (Autoradiographie). Die Kontroll-Immunpräzipitation mit Maus-IgG (A, Bahn 6) zeigte schwache Reaktion mit dem P11-Antikörper (nicht gezeigt). Kennzeichnung wie in Abb.31. Markerproteine wie in Abb.7.

Um zu testen, ob in einem vom S5-Antikörper immunpräzipitierten Komplex auch das P11-Antigen vorkommt und vice versa, wurde der in Abb. 32 dargestellte Versuch durchgeführt. Die Antikörper P11, T7, S5, X4 und Maus-IgG wurden jeweils an Protein A-Sepharose gebunden und mit dem hnRNP-Extrakt (Bahn 1) inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden auf SDS-Gelen analysiert (Abb.32A, Bahn 2-6) bzw. im Western-Blot (Abb.32B, Bahn 1,2) mit den Antikörpern (hier S5 und X4) getestet. Einige Polypeptide (Antigene) wurden spezifisch aus dem hnRNP-Extrakt isoliert (Pfeile), und der Western-Blot zeigt, daß P11, S5 und X4 in einem Komplex vorkommen können. Leider ist es nicht möglich, mit dieser Art der Analyse zu entscheiden, ob die Verpackungsproteine der hnRNS (s. III, 1) mitisoliert wurden oder nicht, weil sie ein ähnliches Molekulargewicht wie die Antikörper (schwere Kette, sK in Abb. 32) bzw. Antigene besitzen.

3. Protein-hnRNS-Wechselwirkung in hnRNP-Komplexen

Weiterhin ließe sich mit dieser Methodik die Frage beantworten, ob die Antigene mit bestimmten Nukleinsäure-Sequenzen assoziiert sind. Durch die Ergebnisse des "Reverse RIA" (s. II,4) war klar, daß die Antigene mit hnRNS assoziiert sind. Nach Immunpräzipitation der mit den Antigenen assoziierten Sequenzen kann man diese Sequenzen auf verschiedene Weise analysieren. Eine Möglichkeit ist, sie durch Hybridisierung an bekannte DNS-Sequenzen festzustellen.

Bakterielle Plasmide, die rekombinante Drosophila-DNS enthalten, wurden deshalb erworben und isoliert. Die klo-

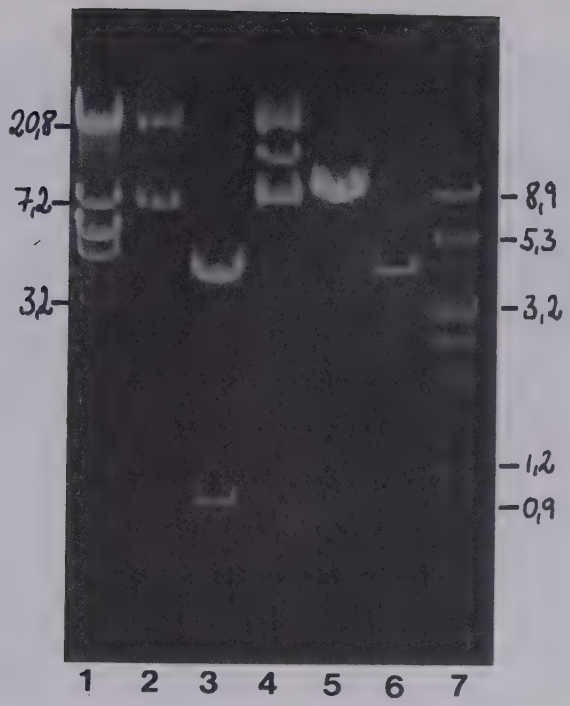


Abb. 33: Restriktionsanalyse von rekombinanten Plasmiden
Gereinigte Plasmid-DNS wurde durch Restriktionsenzyme gespalten und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Bahn 1: Molekulargewichtsmarker: λ DNS mit ECoRI verdaut, die Größe einiger Banden (kb) ist angegeben. Bahn 2: ECoRI-Verdau von 301.1. (Holmgren et al., 1981), 8,2 kb Drosophila DNS-Insertion in pBR322; codiert für das Hitzeschockprotein (HSP) 83,000D (locus 63BC). Bahn 3: PstI-Verdau von pG3.1 (Subklon von pG3 (Craig et al., 1979), enthält 1 kb Drosophila-DNS insertiert in pBR322, nur proteincodierende Sequenzen für das HSP 70,000D (locus 87AC), Geschenk von R.Dequin). Bahn 4: ECoRI-Verdau von DmA2 (Fyrberg et al., 1981), enthält 8,7 kb Drosophila DNS insertiert in pBR322; codiert ein Actinprotein (locus 5C). Bahn 5: BamHl-Verdau von DmA4 (linearisiertes Plasmid, Fyrberg et al., 1981), enthält 3,8kb Drosophila-DNS insertiert in pBR322; codiert ein Actinprotein (locus 57A). Bahn 6: PstI-Verdau von pBR322 (linearisiertes Plasmid), 4,361 kb. Bahn 7: Molekulargewichtsmarker: HindIII-Verdau von Adenovirus-DNS, einige Größen sind angegeben (kb).

nierten Actingene DmA2 und DmA4 wurden von Dr. E. Fyrberg (John Hopkins University, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt, ein kloniertes Hitzeschockgen im Plasmid 301.1. von Dr. V. Corces (Harvard University, Boston, USA) und ein kloniertes Hitzeschockgen im Plasmid pG3 von Dr. E. Craig (University of Wisconsin, Madison, USA) bzw. der Subklon pG3.1. von Raymond Dequin. Die Restriktionskarten dieser Plasmide sind bekannt, und weitere Eigenschaften der Gene sind in der Legende der Abb.33 bzw. den dort zitierten Referenzen zu finden. Abb.33 zeigt eine Analyse der Plasmide nach Verdau mit Restriktionsenzymen, um nachzuweisen, daß die verwendeten Plasmide die entspechenden insertierten Gene besitzen (s. Legende zu Abb. 33).

Diese Plasmide wurden durch "Nicktranslation" (Rigby et al., 1977) radioaktiv markiert und mit RNS hybridisiert in einer sogenannten "Dot-Blot-Hybridisierung" (Thomas, 1980). Gereinigte, denaturierte RNS aus dem hnRNP-Extrakt (E in Abb. 34) und aus Immunpräzipitaten mit verschiedenen Antikörpern (s. Abb.34) wurden auf Nitrozellulose-Rundfilter gebunden (Doppelwerte) und mit der DNS von vier Plasmiden hybridisiert. Die gleiche Menge pulsmarkierter RNS wurde eingesetzt, um die Stärke der Hybridisierung zu vergleichen. Das Ergebnis in Abb.34 ist repräsentativ für drei (301.1. und pG3.1) bzw. zwei (DmA2 und DmA4) unabhängige Experimente.

Das Actingen im Plasmid DmA4 wird offensichtlich von Kc-Zellen weder im Nichthitzeschock (NHS) noch im Hitzeschockfall (HS) transkribiert. Rätselhaft ist das mit dem Plasmid DmA2 erhaltene Ergebnis. Obwohl beide Actingene

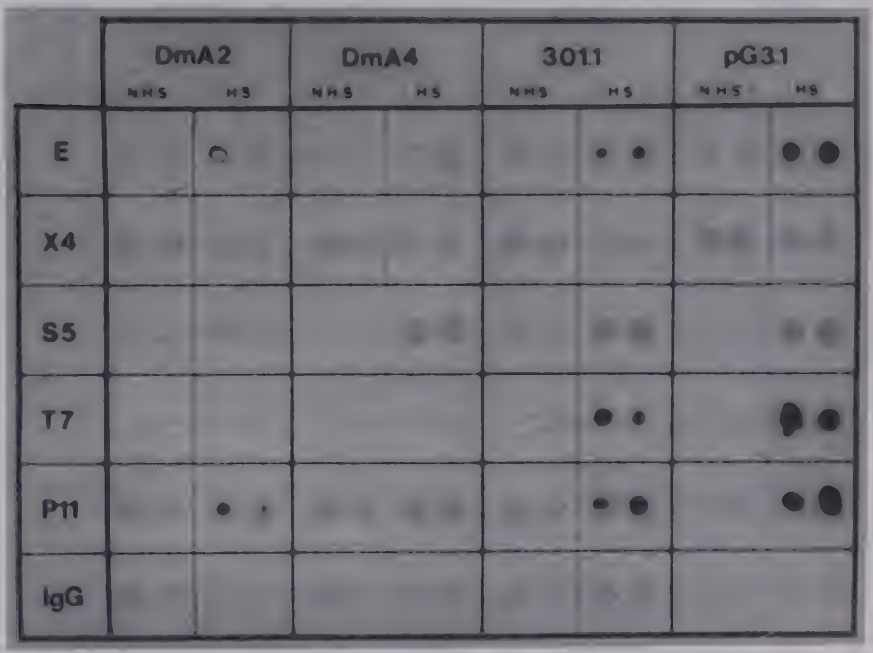


Abb. 34: Dot-Blot-Hybridisierung
Pulsmarkierte RNS aus dem hnRNP-Extrakt (E) und Immunpräzipitaten der Antikörper X4, S5, T7, P11 und Maus-IgG (IgG) von Zellen, die bei 28°C (NHS) und 37°C (HS) kultiviert worden waren, wurde gereinigt, mit Glyoxal denaturiert und auf Nitrozellulose-Rundfilter pipettiert (s. Material und Methoden, NHS: 2200cpm ^{3}H-RNS, HS: 1500cpm ^{3}H-RNS). Die filtergebundene RNS wurde mit ^{32}P-markierter Plasmid-DNS (Rigby et al., 1977; DmA2: 5,75x10^{7} cpm/ug; DmA4: 8,35x10^{7} cpm/ug; 301.1: 5,26x10^{7} cpm/ug; pG3.1: 1,72x10^{7} cpm/ug) hybridisiert und gebundene DNS durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

als Repräsentanten für unter Normalbedingungen exprimierte Gene benutzt werden sollten, scheint das DmA2-Gen nur im Hitzeschockfall (und auch hier nicht reproduzierbar) transkribiert zu werden. Dies steht im Widerspruch zu den publizierten Ergebnissen (Zulauf et al., 1981; Findly and Pederson, 1981) und muß mit unabhängigen Methoden noch einmal untersucht werden.

Die beiden Hitzeschockgene 301.1. und pG3.1. zeigen jedoch das erwartete Verhalten. Sie sind unter Nichthitzeschock-Bedingungen gar nicht (pG3.1.) oder nur schwach exprimiert (301.1.), aber stark nach der Hitzebehandlung. Die Antikörper T7 und P11 immunpräzipitieren hnRNP-Komplexe, die diese Transkripte in vergleichbarer Menge zueinander und zum hnRNP-Extrakt enthalten. Im Gegensatz dazu ist in den von den S5- und X4-Antikörpern präzipitierten Komplexen diese RNS nur in sehr geringer Menge vorhanden. Da im Test aber die gleiche Menge pulsmarkierter RNS eingesetzt worden war, enthält die mit den X4- und S5-Antigenen assoziierte RNS andere als die getesteten Sequenzen.

Da das pG3.1-Plasmid nur proteincodierende Sequenzen enthält, belegt dieses Ergebnis außerdem, daß die isolierten hnRNP-Komplexe transkribierte RNS enthält, die später als mRNS im Cytoplasma erscheint.

4. Protein-snRNS-Wechselwirkung in hnRNP-Komplexen

In der Einleitung wurde erwähnt, daß es im Zellkern verschiedene Spezies kleiner RNS (snRNS) gibt, die als RNS-Protein-Partikel entweder isoliert oder assoziiert mit

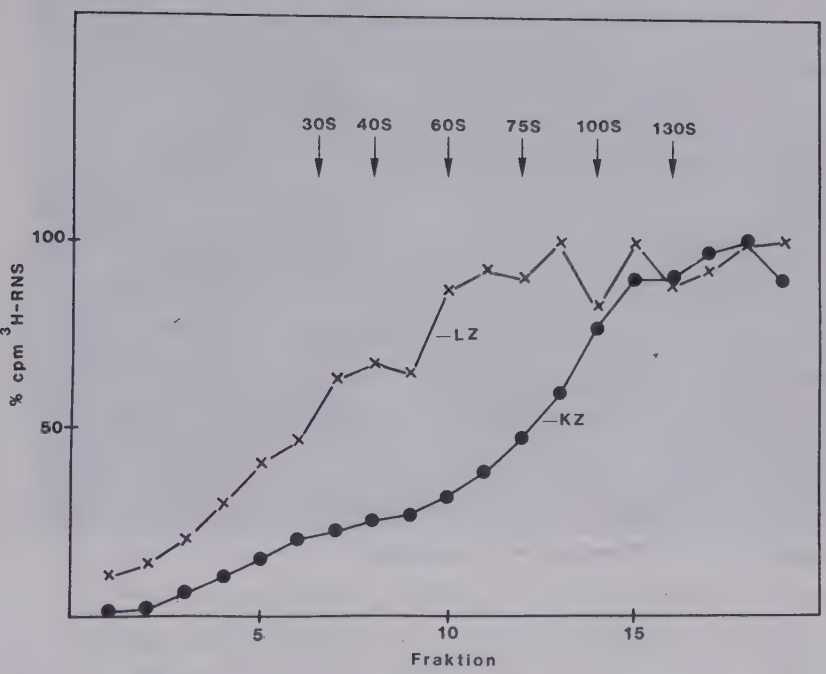


Abb. 35: Verteilung pulsmarkierter und langzeitmarkierter RNS in Sucrosegradienten
HnRNP-Extrakt wurde aus langzeitmarkierten (LZ: 48 Std., 3uCi/ml (5,6)-^{3}H-Uridin) und pulsmarkierten (KZ: 10min, 3uCi/ml) Kc-Zellen isoliert und auf Sucrosegradienten unter Standardbedingungen aufgetrennt.

hnRNP-Strukturen vorkommen. Da manche der untersuchten Antigene sowohl in kleinen als auch großen Partikeln vorkommen (z.B. T7, P11, V4, Q18), bestand die Möglichkeit, daß sie mit dieser Art RNS assoziiert sind. Insbesondere die RNase-sensitiven kleinen antigenenthaltenden Partikel kamen in Frage (z.B. P11, Q18).

Diese snRNS hat im Gegensatz zur hnRNS eine langsame Umsatzrate (Überblick bei Busch et al., 1982). Deshalb wur-

den Kc-Zellen in vivo mit ^{3}H-Uridin über eine lange Zeit (24 72 Std.) inkubiert. Ein aus diesen Zellen isolierter hnRNP-Extrakt zeigt nach Analyse auf Sucrosegradienten mehr radioaktiv markiertes Material in kleineren Partikeln im Vergleich zu pulsmarkierte RNS enthaltendem hnRNP-Extrakt (Abb.35). Dies deutet bereits auf eine RNS hin, die einen langsamen Umsatz hat.

Um einen Überblick über die in Kc-Zellkernen vorkommenden snRNS-Spezies zu bekommen, wurde gereinigte langzeitmarkierte RNS aus dem hnRNP-Extrakt und den Sucrosegradienten-Fraktionen auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert (Abb.36A). Die Bezeichnung erfolgte nach der bei Vertebraten üblichen Nomenklatur. Kürzlich wurden diese snRNS-Spezies auch bei Drosophila von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Mount and Steitz, 1981; Wooley et al., 1982; Ireland et al., 1982).

Einige snRNS-Arten (z.B. U2 und U1) sind in großen Komplexen vorhanden. Dies beruht auf einer ionisch sehr labilen Bindung zu hnRNP-Strukturen (Zieve and Penman, 1981; eigene Versuche, nicht gezeigt).

Aus dem hnRNP-Extrakt mit den Antikörpern X4, S5, T7 und P11 immunpräzipitierte RNS enthält neben hochmolekularer RNS (s. auch V,3) auch snRNS, besonders U2 und U1 (Abb.36B). Das mit dem Antikörper P11 präzipitierte Material enthält darüber hinaus snRNS, die gegenüber dem Extrakt als spezifisch angereichert erscheint.

Da X4, S5 und P11 in gemeinsamen Komplexen vorkommen können (s. V,2) ist eine Mischung von vielen Komplexen mit verschiedenen snRNS-Arten zu erwarten, die eine möglicherweise spezielle Assoziation eines Antigens mit einer snRNS

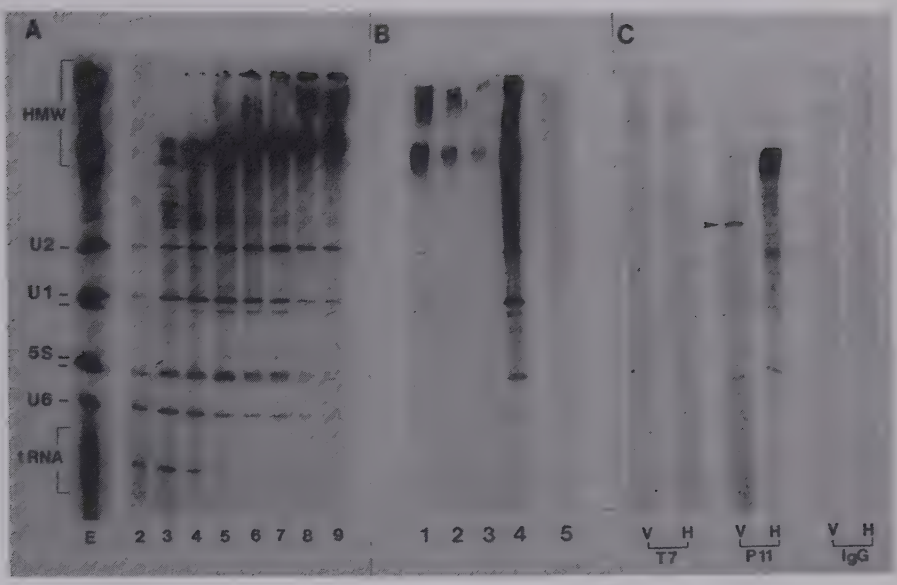


Abb. 36: Verteilung von snRNS-Spezies in subnukleären Fraktionen

A zeigt die Verteilung von snRNS-Spezies im hnRNP-Extrakt (E) und in Sucrosegradienten (Bahn 2-9: neun 1,2ml Fraktionen) durch Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgradientengelen (6-15%). HMW: Hochmolekulare RNS, tRNA = Transfer-RNS, U1, U2, U6: identifizierte snRNS. B zeigt snRNS-Spezies in Immunpräzipitaten aus dem hnRNP-Extrakt mit den Antikörpern X4, S5, T7, P11 und 32-1B6 (Bahn 1-5, der 32-1B6 Antikörper ist ein monoklonaler IgG2a-Maus-Antikörper, der gegen ein Xenopus-Protein gerichtet ist und nicht mit Drosophila kreuzreagiert; Geschenk von Dr. Christine Dreyer). C zeigt die snRNS, die in den Immunpräzipitaten mit den T7, P11 und 321B6 (IgG) Antikörpern aus dem vorderen Teil (V = Fraktion 2-4) bzw. dem hinteren Teil (H = Fraktion 5-9) von Sucrosegradienten enthalten ist.

überdecken. Deshalb wurde der Extrakt auf Sucrosegradienten aufgetrennt und nur der die kleinen Partikel (und nicht pulsmarkierte RNS) enthaltende Teil des Gradienten als Ausgangsmaterial zur Immunpräzipitation verwendet. Abb.36C zeigt, daß der P11-Antikörper aus dem Teil des Sucrosegradien-

ten, der die pulsmarkierte RNS enthält, ähnliche RNS präzipitiert, wie aus dem Gesamtextrakt, während er aus dem anderen Teil spezifisch eine snRNS "herausfischt", die auch im Präzipitat des Gesamtextraktes (Abb.36B, Bahn 4) angereichert war. Diese snRNS ist ungefähr 250 Nukleotide lang und könnte mit der von Wooley et al. (1982) beschriebenen K8 RNS identisch sein.

DISKUSSION

I. Protein-RNS-Wechselwirkung in hnRNP-Komplexen

Der hohe Ribonucleasegehalt einiger Drosophila-Gewebe und Kulturzellen (Lengyel and Penman, 1975) hat vermutlich die Isolierung von hnRNP-Komplexen von Drosophila bisher verhindert. Unter Verwendung von RNase-Inhibitoren konnten bisher nur monomere Partikel isoliert werden (Wooley et al., 1981; Szabo et al., 1981).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß man große hnRNP-Strukturen auch ohne Verwendung von RNase-Inhibitoren aus Drosophila-Kc-Zellen in hoher Ausbeute isolieren kann. Eine wichtige Voraussetzung ist, daß die Isolierung bei tiefen Temperaturen durchgeführt wird und der hnRNP-Extrakt gleich nach der Isolierung weiterverarbeitet wird (s. Abb.13). Die Tatsache, daß man durch einen sehr milden RNase-Verdau (oder endogene RNase) Core-Partikel aus den großen hnRNP-Komplexen erhalten kann, weist darauf hin, daß Drosophila hnRNS in Untereinheiten, die durch RNase-sensitive Stränge verbunden sind, abgepackt wird.

Diese hnRNP-Strukturen enthalten pulsmarkierte RNS, diese eine ähnliche Größe hat wie die aus intakten Kernen isolierte RNS (Abb.5). Da Drosophila relativ kleine hnRNS-Moleküle besitzt (Lengyel and Penman, 1975), erlaubt diese Methode die Isolierung von hnRNP-Komplexen, die nahezu intakte Prämessenger-RNS (ca. 20S, $1x10^6$D, 3kb) enthalten. Diese Komplexe scheinen deshalb sehr geeignet für In-vitro-Processing-Studien zu sein.

Außerdem kann man aus der mittleren Größe der pulsmarkierten, denaturierten RNS (ca. 20S) und einem Protein:RNS-Verhältnis von 4:1 für hnRNP-Komplexe (s. Einleitung) eine mittlere hnRNP-Komplexgröße von ca. 106S ($4{,}6 \times 10^6$D) ausrechnen. Diese Größe stimmt sehr gut mit der tatsächlich gefundenen Größe der hnRNP-Komplexe überein (Abb.4). Deshalb kann man Aggregation von Proteinen an RNS als einen Vorgang ausschließen, der für die Größe der hnRNP-Komplexe verantwortlich ist.

Ob überhaupt eukaryotische hnRNS in vivo als spezielle RNS-Protein-Komplexe vorkommen, oder ob es sich um Isolierungsartefakte handelt, war lange Zeit umstritten (s.Diskussion bei Pederson, 1974). Da Kriterien für eine Beteiligung von Proteinen am strukturellen Aufbau von Komplexen ohne funktionellen Test schwer zu definieren sind, sind die Verpackungsproteine der hnRNS von Eukaryonten (hauptsächlich Vertebraten) erst seit kurzer Zeit bekannt (s.Einleitung).

Kandidaten für Drosophila hnRNS-Verpackungsproteine wurden in dieser Arbeit vorgestellt (s.III,1). Polypeptide mit den Molekulargewichten 54.000, 52.000, 39.000 und 27.000D kosedimentieren in Sucrosegradienten mit pulsmarkierter RNS (Abb.15). Eine weitere Gemeinsamkeit mit den Verpackungsproteinen der hnRNS in Vertebraten ist die Basizität der 54.000 (und 27.000)D-Proteine (Abb.18). Durch UV-Vernetzung konnte außerdem gezeigt werden, daß das 39.000D-Protein spezifisch hnRNS bindet (Abb.17). Obwohl die anderen Polypeptide nicht vernetzt wurden, können sie nicht von einer Beteiligung am strukturellen Aufbau von hnRNP-Komplexen ausgeschlossen werden. Die identifizierten Core-Proteine

von HeLa-Zellen konnten nämlich auch nicht alle an RNS vernetzt werden (van Eekelen and van Venrooij, 1981; s. aber Setyono and Greenberg, 1981).

Keiner der untersuchten monoklonalen Antikörper war gegen eines dieser Polypeptide gerichtet. Für diese Tatsache gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Eine Möglichkeit ist, daß es diese Antikörper in unserer Bank zwar gibt, wir sie aber noch nicht gefunden haben. Dann läßt sich aber auf Grund der Häufigkeit der Verpackungsproteine verglichen mit der der Antigene und der Menge der bisher untersuchten Antikörper (ca. 50 von ca. 300 Zellklonen) abschätzen, daß Antikörper gegen diese Verpackungsproteine unterrepräsentiert sein müssen. Eine andere Möglichkeit ist, daß es diese Antikörper in unserer Bank nicht gibt. Dies könnte damit zusammenhängen, daß die Aminosäuresequenz dieser Polypeptide in der Evolution konserviert wurde und sie deswegen nur schwach immunogen sind. Für die Vertebraten-Verpackungsproteine wurden tatsächlich ähnliche Molekulargewichte und Aminosäurezusammensetzungen gefunden (s.Einleitung) und Antikörper (s.u.), die gegen diese Proteine gerichtet sind, waren schwer herzustellen und kreuzreagierten mit den Verpackungsproteinen anderer Vertebratenspezies (Jones et al., 1980). Drosophila-Verpackungsproteine haben aber zunächst einmal ein anderes Molekulargewicht (außer dem 39.000D Protein; s.III,1), und man findet auch keine Kreuzreaktion der mit den Vertebraten-Proteinen reagierenden Antikörper mit Drosophila (Terence Martin, persönliche Mitteilung). Trotzdem könnten duchaus in allen Organismen konservierte Sequenzen (gegen die die Antikörper aber nicht gerichtet

sind) vorkommen, die die Immunogenität dieser Proteine (die zudem nach einer nicht auf diese Proteine zugeschnittenen Fraktionierung und in einer komplexen Mischung vorhanden sind) herabsetzen. Es ist wahrscheinlich, daß gegen gereinigte Drosophila-Verpackungsproteine Antikörper in der Maus erzeugt werden können.

Konventionelle Antikörper gegen einige vermutlich RNS-bindende Proteine sind bereits benutzt worden, um transkriptionelle Aktivität auf den Lampenbürstenchromosomen von Triturus zu lokalisieren (Sommerville et al., 1978). Jones et al. (1980) konnten mit Antikörpern gegen die hnRNP-Verpackungsproteine der Maus nachweisen, daß diese Proteine nur im Zellkern lokalisiert sind. Diese und die früheren Untersuchungen von Lukanidin et al. (1972a, 1972b) zeigen, daß hnRNS im Kern mit ganz andereren Proteinen assoziiert ist als die mRNS im Cytoplasma (s. Einleitung) und deswegen ein drastischer Umbau während des Transports und evtl. Processing der hnRNS stattfinden muß. Wegen der geringen Umsatzrate dieser Proteine (Martin et al., 1979), der hohen Umsatzrate ihres Substrates und der Befunde, daß keine freien hnRNS-bindenden Proteine im Kern gefunden wurden (Pederson, 1974), konnte man schließen, daß diese Proteine nur übergangsweise an hnRNS gebunden sind und wieder benutzt werden.

Christensen et al. (1981) berichteten, daß ein polyklonaler Antikörper gegen ein Physarum-Kernprotein mit einem 34.000D Polypeptid in Drosophila kreuzragiert und im Kern gleichzeitig Puffs und Interbanden und den Nukleolus anfärbt. Sie behaupteten, daß dieser Antikörper mit den HeLa-

Core-Proteinen kreuzreagiert und spekulierten, daß das kreuzreagierende Drosophila-Protein an der Verpackung von nascierender präribosomaler RNS und hnRNS beteiligt sein könnte. Die Ergebnisse von Jones et al. (1980) wie auch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse (s. Abb. 27) aber geben keinen Hinweis dafür, daß hnRNS-assoziierte Proteine im Nukleolus vorkommen. Ein 34.000D Hauptprotein gibt es außerdem weder in Drosophila-hnRNP-Komplexen (Abb.15) noch in der Analyse von Christensen et al. (1981), außer einem Polypeptid mit der gleichen elektrophoretischen Mobilität wie Histon H1.

II. Assoziation von Antigenen mit hnRNP-Komplexen

Die hohe Anreicherung pulsmarkierter RNS im hnRNP-Extrakt erlaubte es, direkt den Extrakt im RIA auf Anreicherung von Antigenen zu testen (Tabelle 2). Alle in Puffs und Interbanden lokalisierten Antigene sind im Extrakt angereichert und somit mögliche hnRNS-assoziierte Proteine. Das Vorkommen der Antigene in hochmolekularen Protein-RNS-Komplexen und die Verteilung der Antigene zueinander und zur pulsmarkierten RNS wurde durch radioimmunometrische Analyse von in Sucrosegradienten aufgetrennten hnRNP-Strukturen analysiert. Diese Ergebnisse sollen später für die einzelnen Antigene diskutiert werden (s. IV).

Das Vorkommen der Antigene auf polytänen Chromosomen in einer Reihe von Puffs und Interbanden läßt vermuten, daß bei einer Beteiligung dieser Antigene am Processing sie an Vorgängen beteiligt sind, die vielen Transkripten gemeinsam sind. Das Verteilungsmuster der verschiedenen Antigene ist

sehr ähnlich, und selbst durch quantitative Immunfluoreszenz kann man nur sehr geringe Unterschiede in der Verteilung der Antigene X4, S5 und P11 feststellen. Dies deutet darauf hin, daß diese Antigene in gleichen Komplexen vorkommen, was in der Arbeit auch durch andere Methoden (s. V2) nachgewiesen werden konnte. Andererseits können sich die Antigene unabhängig voneinander verteilen. Am deutlichsten läßt sich dies in einem Hitzeschockexperiment beobachten. Sowohl die Verteilung der Antigene auf polytänen Chromosomen (s.Abb.27 für die Verteilung der Antigene P46 und Q18; die anderen Antigene wurden von Amalia Dangli, Universität Heidelberg, analysiert) als auch die Sedimentationseigenschaften der die Antigene enthaltenden Komplexe (s. Abb.25 und 26) können sich unabhängig voneinander ändern. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Antigene sowohl in konzertierter Aktion als auch allein Funktionen erfüllen können.

Das ausschließliche Vorkommen der Antigene im Zellkern (Abb.28) zeigt eine an den Kern gebundene Funktion der Antigene an. Die Verteilung im Kern selbst scheint aber unterschiedlich zu sein. Während die Antigene X4 und S5 z.B. ausschließlich auf Chromosomen lokalisiert sind und ein klares Bandenmuster ergeben, ist das P46-Antigen auch in den Räumen um die Chromosomen herum, aber nicht im Nukleolus zu finden. Abhängig von den Fixierungsbedingungen kann man auch das T7-Antigen in dieser Weise verteilt finden. In Quetschpräparaten von Drosophila hydei Spermatozyten (K.H.Glätzer, Universität Düsseldorf, persönliche Mitteilung) und in Schnitten von polytänen Kernen (Raymond Dequin, persönliche Mitteilung) kann man ebenfalls diese beiden

Antigene im Gegensatz zu den anderen über den ganzen Zellkern (Nukleoplasma) verteilt finden. Diese unterschiedliche Verteilung ist offenbar nicht korrelierbar mit der Anwesenheit der Antigene in großen oder kleinen Partikeln bzw. der Kosedimentation mit hnRNS im Sucrosegradienten.

HnRNP-assoziierte Proteine, die ausschließlich am Chromatin vorkommen (S5, X4), könnten an Processing-Mechanismen beteiligt sein, die nur am Chromatin stattfinden (z.B. Schneiden des Transkriptes an der polyA-Additionsstelle, s. Einleitung). Derartige Vorgänge sind im Elektronenmikroskop beobachtet worden, und besondere Partikelstrukturen sind an Stellen von Transkripten entdeckt worden, an denen diese Reaktionen stattfinden (Beyer et al., 1981). Im Nukleoplasma und auf polytänen Chromosomen vorkommenden Proteinen könnte dann eine Rolle beim Transport oder bei zeitlich späteren Processing-Ereignissen zukommen.

Die Verteilung der Antigene in Sucrosegradienten ist stark abhängig von der Zugabe exogener RNase oder dem Verdau durch die im Extrakt enthaltene endogene RNase (Abb.13). Es ist offen, ob es sich beim letzteren Vorgang um in vitro Processing oder um Abbau handelt. Überraschend aber ist der beobachtete Alterungseffekt (s.II, 3). Die Tatsache, daß hnRNP-assoziierte Proteine trotz der relativen Intaktheit dieser Strukturen abdissoziieren, könnte auf übergangsartige Assoziation hindeuten.

Der umgekehrte Vorgang wurde nach EDTA-Behandlung des hnRNP-Extraktes beobachtet. Alle Antigene sind in schneller sedimentierenden Komplexen zu finden (s.IV, 1). Andere Autoren haben festgestellt, daß sich durch EDTA-Behandlung die

RNase-Sensitivität von hnRNP-Strukturen erhöht (Zieve and Penman, 1981). Herman et al. (1978) fanden eine EDTA-sensitive Bindung von polyA-Sequenzen an die Kernmatrix. Diese erhöhte Sensitivität konnte bei Drosophila-hnRNP-Komplexen nicht festgestellt werden (nicht gezeigt). Der Kernmatrix wurden zahlreiche Funktionen beim Processing und Transport von hnRNP-Komplexen zugeschrieben. Die Signifikanz der Beobachtungen ist jedoch unklar, weil es die bisher als Kernmatrix isolierte und beschriebene Struktur vielleicht gar nicht gibt (Kaufmann et al., 1981).

Die in dieser Arbeit beobachtete Änderung der Sedimentation der antigenenthaltenden Partikel durch EDTA ließe sich aber auch interessanterweise so interpretieren, daß der Entzug zweiwertiger Ionen die Dissoziation der Antigene von der hnRNS (das Processing?) verhindert.

Eine weitere Frage in diesem Zusammenhang ist, ob die Antigene tatsächlich RNS binden bzw. wie eng sie mit der RNS assoziiert sind. Die UV-Vernetzungsexperimente wurden deshalb auch auf die mögliche Vernetzbarkeit von Antigenen an RNS getestet (nicht gezeigt). Das einzige Antigen, das in der an oligo-dT-Zellulose gebundenen Fraktion in höherer Menge vorhanden war als in der nichtgebundenen Fraktion war das P11-Antigen. Folglich ist auch keiner der Antikörper (in Frage käme hauptsächlich T7) gegen das durch diese Methode entdeckte polyA-bindende Drosophila-Protein gerichtet.

Diese Antikörper wären wertvolle Hilfsmittel bei der Untersuchung des Processing, wenn sie mit anderen Organismen, die z.B. zur Isolierung eines in vitro Processing Systems verwendet werden oder vielleicht einmal verwendet

werden könnten (s. z.B. Weingärtner and Keller, 1981; Yang et al., 1981), kreuzreagieren würden. Viele der Antigene sind aber sehr speziesspezifisch (der P11-Antikörper reagiert z.B. nicht einmal mehr mit Drosophila hydei), und nur der T7-Antikörper zeigt eine sehr gute Kreuzreaktion mit Amphibien (Lampenbürstenchromosomen von Xenopus, nicht gezeigt) und mit Säugetieren (Hügle et al., 1981).

Diese Untersuchungen haben auch erwiesen, daß das T7-Antigen z.B. während der Mitose in der ganzen Zelle verteilt wird und nicht an Chromosomen bindet. Nach der Zellteilung ist es dagegen wieder ausschließlich im Kern vorhanden (Hügle, 1981). HnRNP-Verpackungsproteine der Maus zeigen auch dieses Verhalten, und mit Hilfe von Transkriptionsinhibitoren konnte man nachweisen, daß für die Akkumulation im Kern nicht die Ausbildung des Interphasekerns, sondern die Anwesenheit des Substrates (Templates) im Kern verantwortlich ist (Terence Martin, persönliche Mitteilung).

Diese Beobachtungen lassen sich korrelieren mit Ergebnissen, die in unserer Arbeitsgruppe durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Dünnschnittpräparaten von Ovarien und Embryonen von Drosophila melanogaster erhalten wurden. Viele hnRNP-assoziierte Antigene (P11, S5, X4) halten sich vor dem Blastoderm in den zytoplasmatischen Inseln, aber nicht in den Kernen auf. Zu einem Zeitpunkt, der ungefähr mit dem Beginn der embryonalen Transkriptionsaktivität übereinstimmt, wandern die Antigene dann in den Kern (Harald Saumweber, Raymond Dequin, persönliche Mitteilung). Eine interessante Frage wäre, ob diese Antigene in den zytoplasmatischen Inseln mit maternaler RNS assoziiert sind, welcher

Eigenschaften von hnRNS zugeschrieben werden (Davidson et al., 1982).

III. Quantifizierung der Antigenmenge

Das Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, monoklonale Antikörper gegen genregulatorische, möglicherweise entwicklungsspezifische Proteine zu gewinnen. Da diese Proteine wahrscheinlich in geringer Kopienzahl im Zellkern vorkommen, wäre es wichtig zu wissen, ob die angewendeten Methoden (RIA, Immunfluoreszenz, Blot) empfindlich genug sind, diese Proteine nachzuweisen und ob bei einer Immunisierung mit komplexen Proteinmischungen eventuell nur Antikörper gegen Hauptkomponenten erhalten werden können (vorausgesetzt, diese sind immunogen). Die Beantwortung dieser Frage hängt von der Kenntnis der Kopienzahl der jetzt untersuchten Antigene ab.

Versuche, im RIA und auf polytänen Chromosomen die Antigenmenge zu quantifizieren, sind bis jetzt noch nicht gelungen. Die Menge des ^{125}J-RAMfab-Antikörpers, der im RIA gebunden wird, reflektiert nämlich nicht unbedingt die Menge des gebundenen Antigens, sondern ist abhängig von der Affinität bzw. Bindungskapazität des monoklonalen Antikörpers (z.B. groß für P11) für diesen RAMfab-Antikörper (Peter Symmons, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit wurde die Antigenmenge nach densitometrischer Auswertung der Färbungsintensität einiger Kernprotein- bzw. Antigenspots auf 2D-Gelen bestimmt. Vor- und Nachteile dieser Methode wurden bereits im Ergebnisteil angesprochen. Fehler ergeben sich

durch die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Proteine (s. Tabelle 3).

Aus der mit Hilfe dieser Methode bestimmten Kopienzahl z.B. des Pll-Antigens (etwa $1x10^5$ Kopien/Zelle bzw. $2,5x10^4$ Kopien/haploides Genom; unter der Annahme, daß die Kc-Zellen tetraploid sind (Peter Symmons, persönliche Mitteilung)) kann man die Zahl der Moleküle des Pll-Antigens pro Transkript feststellen. Unter der Annahme, daß 20 % der RNS im Kern einer Kc-Zelle (ca. 0,5 pg RNS/Zellkern) hnRNS ist (Levis and Penman, 1977) und die durchschnittliche Größe der hnRNS 3kb ($1x10^6$D) ist, kann man ausrechnen, daß ca. 2 Moleküle Pll pro Transkript vorhanden sind. Die Quantifizierung der Verpackungsproteine der hnRNS vom gleichen Gel ergibt eine Anzahl von 20 Molekülen des 54.000D Proteins pro Transkript.

Die Menge des Pll-Antigens entspricht ungefähr 0,02% der Gesamtkernproteinmenge (11,7pg Protein/Zellkern). Die Kenntnis der Zahl der Moleküle des Pll-Antigens pro Puff ließe Schlüsse auf die Empfindlichkeit der Immunfluoreszenz zu. In polytänen Kernen sind nur 20% der Pll-Antigenmenge (normalisiert auf DNS-Menge) im Vergleich zu Kc-Kernen vorhanden (Frasch, 1981). Dies würde bei einem Polytäniegrad von 512/haploides Genom einer Kopienzahl von $5x10^6$ Molekülen pro Kern bzw. 0,4 Molekülen Pll pro Transkript entsprechen, wenn in polytänen Kernen der gleiche Anteil und gleich große hnRNS wie in Kc-Kernen vorliegt. Nimmt man an, daß es pro Transkriptionseinheit ungefähr 10-30 Transkripte gibt (Beyer et al., 1981) und daß alle nebeneinanderliegenden DNS-Stränge transkribiert werden, ergibt sich eine Zahl von ca. 10^4

Molekülen pro Puff. Geht man bei einer anderen Berechnung davon aus, daß das P11-Antigen an ungefähr 300 Stellen auf dem Chromosom vorkommt, ergibt sich eine Zahl von $1,7 \times 10^4$ Molekülen pro Stelle, die gut mit der ersten Berechnung übereinstimmt. Da es bei Analyse des P11-Antigens ungefähr 70 Stellen starker, 100 Stelln mittlerer und 130 Stellen schwacher Fluoreszenzintensität auf polytänen Chromosomen gibt und die Quantifizierung einen Faktor 100 Intensitätsunterschied zwischen schwachen und starken Stellen ergibt (Peter Symmons, persönliche Mitteilung), sind ungefähr 600 Moleküle an einer Stelle schwacher Intensität sichtbar. Das bedeutet, daß man ein Molekül pro DNS-Doppelstrang und somit wahrscheinlich auch genregulatorische Proteine auf polytänen Chromosmen sehen kann.

Eine Immunisierung mit komplexen Proteinmischungen kann also durchaus monoklonale Antikörper gegen Komponenten erzeugen, die selten in der Mischung vorkommen, sofern sie in ausreichender Menge verabreicht wurden, eine Immunantwort zu stimulieren.

IV. Mögliche Funktion der Antigene

Im folgenden soll versucht werden, die Ergebnisse für jedes einzelne Antigen zusammenzufassen, um, wenn möglich, Voraussagen über ihre Funktion zu machen. Da die Antigene in Gruppen eingeteilt wurden (s. II,2), soll aber vorher kurz auf diese Einteilung eingegangen werden, die auf der unterschiedlichen Verteilung in Sucrosegradienten bzw. dem Vorkommen der Antigene in kleinen Partikeln beruht. Die Frage ist, ob die in kleinen Partikeln vorkommenden Antigene nicht

in vivo auch nur mit großen hnRNP-Strukturen (wie P46, X4 und S5) assoziiert sind und sich nur durch die Isolierungsprozedur diese unterschiedliche Verteilung im Sucrosegradienten ergibt. Die Anwesenheit der Antigene P11, T7, V4 und Q18 in kleinen Partikeln ist aber nicht auf die Dissoziation von großen Komplexen, verursacht durch den Salzgehalt des Puffers, zurückzuführen, weil nur 2 % der pulsmarkierten RNS und nur eine geringe Menge der Antigene (weniger als 10 %) durch den EDTA-Wasch bzw. durch eine Inkubation in TMN-Puffer (ohne Ultraschallbehandlung) extrahierbar ist (Daten nicht gezeigt). Im Gegenteil sind alle Antigene in dem Maße im hnRNP-Extrakt angereichrt wie pulsmarkierte RNS (s. Tabellen 1 und 2). Diese Ergebnisse zeigen auch, daß es keine große Menge an freien Antigenmolekülen im Kern gibt.

Eine andere Möglichkeit ist, daß diese antigenenthaltenden Komplexe durch die Ultraschall-Behandlung von den großen hnRNP-Strukturen abgelöst werden. Die Reproduzierbarkeit der Verteilung der Antigene auch bei kürzerer Ultraschall-Behandlung (nicht gezeigt) wie auch das Vorkommen der Antigene in verschiedenen kleinen, nicht pulsmarkierte RNS enthaltenden, gegen RNase verschieden sensitiven Partikeln (und nicht als freie Proteine) schließt diese Möglichkeit weitgehend aus.

Aus der Abhängigkeit der Assoziation dieser (und der anderen) Antigene mit hnRNP-Strukturen von zweiwertigen Ionen, Hitzeschock und RNase könnte man jedoch schließen, daß diese kleinen Partikel

- nur schwach mit hnRNP assoziiert sind, aber dazu reversibel in der Lage sein können,

- tatsächlich in vivo in großer Menge mit hnRNP assoziiert sind, jedoch in einem sehr labilen Gleichgewicht (Processing?).

Diese Fragen ließen sich durch in vivo Protein-Protein-Vernetzung (reversibel) evtl. in Kombination mit Protein-RNS-Vernetzung klären. Die Immunpräzipitation derartiger Komplexe würde klare Aussagen über Protein-Protein(Antigen)- und Protein-RNS-Wechselwirkungen in den hnRNP-Komplexen ermöglichen.

Diskussion der einzelnen Antigene:

GRUPPE 1

1. X4: Das X4-Antigen kosedimentiert (ausschließlich) mit pulsmarkierter RNS, zeigt aber einen Alterungseffekt und dissziiert bei > 200mM NaCl von der hnRNS. Als einziges Antigen wird nach einem Hitzeschock sein Sedimentationsverhalten in Sucrosegradienten stark beeinflußt. Die Hitzeschockbehandlung (und Alterung) bewirken eine Verschiebung der Sedimentation zu kleineren Komplexen. Diese Komplexe könnten z.B. im Abbau befindliche RNS-Sequenzen enthalten, an deren Degradation das X4-Antigen in irgendeiner Weise beteiligt ist.

2. S5: Die Verteilung der S5- und X4-Antigene zeigt in Gradienten und bei quantitativer Analyse auf polytänen Chromosomen nur sehr geringe Unterschiede. S5 kann jedoch mehr als X4 in Komplexen von 40-60S angereichert werden (Alterungseffekt?). Diese Komplexe weisen dann ein größeres S5:RNS-Verhältnis auf als die 90-130S-Komplexe. Weder durch kurze Pulsmarkierung der RNS (30 sec) noch durch Pulse-Chase-Experimente (nach Levis and Penman, 1977) konnte in

den kleineren Komplexen markierte RNS angereichert werden (nicht gezeigt). Unter Hitzeschockbedingungen verteilt sich das S5-Antigen sowohl auf polytänen Chromosomen (Amalia Dangli, persönliche Mitteilung), wie auch in Gradienten anders als X4. Das S5-Antigen kann also sowohl im Komplex mit X4 als auch getrennt vorkommen.

3. P46:: Das P46-Antigen kosedimentiert auch unter 0,3M NaCl noch mit der hnRNS, was eine feste Bindung zwischen den Molekülen (wahrscheinlich indirekt, s.Teil I der Diskussicn) andeutet. Da es erst später als die Antigene X4, S5, P11 und T7 als RNS-assoziiertes Protein erkannt wurde, ist es in vielen Tests noch nicht analysiert worden. Es ist aber ein saures Protein, das im Kern vorwiegend im Nukleoplasma lokalisiert ist und zusätzlich auf noch nicht charakterisierten Stellen auf dem Chromosom vorkommt.

GRUPPE 2:

4. P11: Das P11-Antigen ist ein basisches Protein, das in etwa 10^5 Kopien im Zellkern von Kc-Zellen vorkommt. Das Vorkommen in Assoziation mit hnRNP-Komplexen ist stark RNase- und salzsensitiv, und das Antigen zeigt in Sucrosegradienten häufig eine Aufspaltung in einen vorderen (20-50S) und hinteren (50-150S) Teil. Die Partikel aus dem vorderen Teil des Gradienten enthalten eine snRNS, die in sehr geringer Menge im Vergleich zu den Spezies U1 und U2 im Zellkern von Kc-Zellen vorkommt.

Die Beobachtung, daß P11 besonders in großen Puffs zu finden ist, und die Vermutung, daß die Bildung von Puffs mit der Speicherung von Transkripten zusammenhängt (Beermann, 1952; Bonner and Pardue, 1977) hat zu der Hypothese geführt,

daß P11 an der Speicherung von Transkripten bzw. der Regulation des Transportes von Transkripten beteiligt ist (Kabisch, 1982). Wenn die snRNS des P11-Partikels eine Adapter-Funktion hat, d.h. komplementäre (Signal) Sequenzen auf der hnRNS erkennt, könnte dieses Partikel eine ähnliche Rolle spielen wie das "Signal Recognition Particle" (Walter and Blobel, 1982) (s. Einleitung), das bei der Translokation von Proteinen durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums und der Integration in diese Membran eine große Rolle spielt.

5. T7: Das T7-Antigen ist ein basisches Protein und zeichnet sich durch die Konserviertheit der antigenen Determinante in anderen Organismen und die RNase-Stabilität seines 20-30S-Partikels aus. Es ist wie das P46-Antigen im Kern deutlich auch im Nukleoplasma vorhanden. Es ist unklar, ob die Menge des T7-Antigens, die mit hnRNS kosedimentiert, auf Chromosomen lokalisiert ist und die als 20-30S-Partikel vorliegende Menge nur im Nukleoplasma vorkommt. Es gibt Spekulationen, daß das T7-Antigen mit der "cap"-Struktur von RNS-Polymerase II-Transkripten (s.Einleitung) assoziiert sein könnte (Buddy Setyono, persönliche Mitteilung).

6. V4: Beim V4-Antigen handelt es sich um ein saures Protein, das ähnlich wie T7 im Gradienten verteilt ist, dessen 20-30S-Partikel aber RNase sensitiv ist. Immunfluoreszenz-Untersuchungen weisen darauf hin, daß es anders auf Puffs und Interbanden verteilt ist als die anderen Antigene. Es ist nicht bekannt, ob eine snRNS in den kleinen RNase-sensitiven Partikeln vorhanden ist. Dieses Antigen ist ebenso wie das P46- und Q18-Antigen (s.u.) erst später in die

Sammlung der RNS-assoziierten Proteine aufgenommen worden und deshalb nicht in allen Tests analysiert worden.

GRUPPE 3:

7. Q18: Dieses Antigen ist wie das P11-Antigen basisch, und man findet es in Hitzeschockexprimenten auf polytänen Chromosomen ebenso wie die P11- und P46-Antigene vorwiegend im Puff 93D. In der indirekten Immunfluoreszenz auf Kc-Zellen ist das Antigen punktartig über den Kern verteilt (nicht gezeigt). Es ist aber noch nicht geklärt, ob das kleine Q18-Partikel eine snRNS enthält.

8. Y55: Das Y55-Antigen kommt nur in Interbanden der polytänen Chromosomen vor und ist kein hnRNP-assoziiertes Protein. Es verhält sich auf Sucrosegradienten wie ein lösliches Protein, wird aber nicht durch TMN-Puffer aus Kernen extrahiert. Es besteht die Möglichkeit, daß dieses Antigen durch die Ultraschall-Behandlung in eine lösliche Form übergeht. Durch schonende Isolierungsverfahren von Chromatin sollte es möglich sein festzustellen, ob dieses Antigen mit DNS assoziiert sein könnte. Die interessante und testbare Möglichkeit ergäbe sich dann, daß dieses Protein mit der nur in Interbanden vorkommenden Z-DNS (Nordheim et al., 1982) assoziiert ist. Nordheim et al. (1982) haben tatsächlich einige hochmolekulare Polypeptide gefunden, die spezifisch an Z-DNS binden.

V. Modellvorstellungen von Protein-RNS-Wechselwirkungen beim Processing

Die differentielle Verteilung der Antigene in Sucrosegradienten läßt auf eine Heterogenität der Protein- (bzw. Antigen-) Zusammensetzung von hnRNP-Komplexen schließen (s. IV). Frühere Untersuchungen haben eher eine Uniformität von hnRNP-Strukturen ergeben, obwohl möglicherweise auch die strukturellen Einheiten (Core-Partikel) nicht zufällig auf der RNS verteilt sind (Beyer et al., 1980). Die aus diesen Ergebnissen resultierenden Vorstellungen haben die Dynamik der Vorgänge des Processing außer acht gelassen. Verschiedene Transkripte können z.B. verschiedene Substrateigenschaften für Proteine haben, z.B. das Vorhandensein oder Fehlen von Intron- oder polyA-Sequenzen oder Sequenzen, die im Kern degradiert, gespeichert oder ins Zytoplasma transportiert werden. Dies könnte zu einer unterschiedlichen Proteinzusammensetzung von hnRNP-Komplexen führen, diee Übergangszustände im Processing der hnRNS reflektieren könnten. Da die Antigene nur im Zellkern vorkommen, die RNS aber ins Zytoplasma transportiert werden muß, ist die Bedingung einer übergangsartigen Assoziation erfüllt (auch für die Verpackungsproteine). Ob die Antigene ähnlich wie die Verpackungsproteine zwischen hnRNS-Molekülen ausgetauscht bzw. wiederverwendet werden können (s. Teil I der Diskussion), oder ob sie eine hohe Umsatzrate haben, ist noch nicht geklärt.

Es gibt Hinweise dafür, daß die Sekundärstruktur der hnRNS bzw. von hnRNP wichtig ist für die Kontrolle des Processing (Khoury et al., 1979), denn die in der Einleitung

erwähnten posttranskriptionellen Kontrollen z.B. durch differentielles Splicing (Crabtree and Kant, 1982)können nicht einfach durch einen "Scanning"-Mechanismus des Splicing ähnlich der ribosomalen Proteinsynthese (Sharp, 1981) erklärt werden, obwohl der vorgeschlagene Mechanismus selbst richtig sein könnte. Durch die Aufklärung der molekularen Ursache zahlreicher Thalassämien (s. Einleitung) mit Hilfe rekombinanter DNS-Technologie ist klar geworden, daß es sich um mindestens zwei Ebenen der Regulation handeln muß. Die Entscheidung über Splicing oder Nicht-Splicing ist nämlich ein von der Entscheidung über Stabilität oder Instabilität der (mutierten) RNS unabhängiger Vorgang (Maquat et al., 1981; Treisman et al., 1982; Felber et al., 1982). Bei beiden Entscheidungen könnten Proteine, die die Sekundärstruktur der RNS beeinflussen, eine wichtige Rolle spielen. Unter der Annahme, daß Transkripte eines bestimmten Gens immer in einer bestimmten Sekundärstruktur angeordnet werden, die durch den Einfluß einiger (Nichtverpackungs-)Proteine der hnRNS bestimmt wird, wäre ein bestimmter Processing-Schritt abhängig von der Sekundärstruktur und nicht vom Splicing-Apparat selbst. Auch die Interaktion der Proteine mit der hnRNS müßte disem Modell entsprechend nicht unbedingt an den Consensus-Sequenzen (s. Einleitung) stattfinden.

Die Verteilung der Antigene auf polytänen Chromosomen mit Hilfe der direkten quantitativen Immunfluoreszenz (Risau et al., 1983) könnte zur Unterstützung dieser Idee herangezogen werden. Das unterschiedliche Verhältnis der Antigene (S5 und T7) in verschiedenen Puffs, die unterschiedlich von

Ecdyson reguliert werden, könnte durch die unterschiedliche Zahl von Bindungsstellen für die Antigene auf dem Transkript erklärt werden. Eine Kombinatorik dieser Art könnte verschiedene Sekundärstrukturen von Transkripten determinieren, die dann nicht nur für das Splicing, sondern auch für die anderen Schritte des Processing wichtig wäre.

Das Verhältnis der Antigene in einem Puff ist aber nicht immer gleich. Die Analyse der Antigene X4 und S5 in einem Ecdyson-kontrollierten Puff ergab, daß es in verschiedenen Ecdyson-kontrollierten Entwicklungsstadien unterschiedliche Verhältnisse der Antigene zueinander gibt. Diese Beobachtung könnte mit unterschiedlichen Intermediaten des Processing dieser Transkripte oder mit einer Regulation des Processing (Abbau, Speicherung oder Transport des Transkripts) durch die Sekundärstruktur der Transkripte, die wiederum durch das Verhältnis bestimmter assziierter Proteine bestimmt wird, erklärt werden.

Alle diese Ideen sind mit Hilfe der monoklonalen Antikörper zu testen. Im Elektronenmikroskop könnte z.B. analysiert werden, ob die Antikörper an bestimmte Stellen der Transkripte (s.Beyer et al., 1981) gebunden werden. Das in vitro Ecdyson-System (Ashburner, 1972) könnte benutzt werden zur Auswertung der Kinetik der Assoziaton der Antigene und der Verhältnisse der Antigene zueinander zu einem bestimmten Zeitpunkt. Der Reverse RIA oder die Immunpräzipitation der mit Antigenen assoziierten hnRNS-Sequenzen mit nachfolgender Analyse durch Hybridisierung mit klonierten Sequenzen könnten Fragen beantworten, die die Assoziation von Antigenen an RNS unterschiedlicher Processing-Intermediate oder

die mit ihnen assoziierte RNS-Sequenz betreffen. Eine Hybridisierung mit klonierten Sequenzen von Processing-Intermediaten könnte Aufschluß darüber geben, ob bestimmte Antigene nur an unprocessierte oder processierte Transkripte binden bzw. Bindungsstellen erkennen, die in der mRNS nicht mehr vorhanden sind. Die Kenntnis der Sequenz selbst würde Versuche erlauben (zum Beispiel in vitro-Mutagenisierung dieser Sequenz; siehe Thalassämien (Einleitung), die den Einfluß dieser Sequenz bzw. Antigenbindungsstelle auf das Processing beantworten könnten.

ABKÜRZUNGEN

BSA	Rinderserumalbumin
CA	Carboanhydrase
D	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
hnRNS	heterogene nukleäre RNS
hnRNP	hnRNS enthaltende Ribonukleoproteinpartikel
IgG	Immunglobulin G
IP	isoelektrischer Punkt
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
mRNS	messenger RNS
NEPHGE	nicht-äquilibrierte-pH-Gradient-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PGK	Phosphoglyceratkinase
RAM	Kaninchen-anti-Maus
RI	RNase-Inhibitor
RIA	Radioimmuntest
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNS	ribosomale RNS
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNS	kleine nukleäre RNS
tRNS	transfer RNS
TI	Trypsininhibitor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

MATERIAL UND METHODEN

I. Isolierung und Analyse von subnukleären Partikeln und Kernproteinen von Drosophila Kc Zellen

1. Zellkultur und in vivo Markierung von Drosophila Kc-Zellen

Drosophila Kc-Zellen wurden in D20-Medium (serumfrei; Echalier and Ohanessian, 1970) bei 25°C in Rührkultur gehalten. Nach Erreichen einer Zelldichte von $6x10^6$ Zellen/ml wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500UpM, 10min, GSA-Rotor) geerntet und in einem Fünftel des Ausgangsvolumens resuspendiert in einer 1:1-Mischung des alten Mediums und eines D20- Mangelmediums, das anstelle des Hefeextraktes dialysierten (2 Tage, viermaliger Wechsel, gegen 1/10 PBS) Hefeextrakt enthielt. Nach 15min in Rührkultur bei 25°C wurden zur Pulsmarkierung der RNS die Zellen mit 4µCi/ml (5,6-^{3}H)-Uridin (NEN) 10min bei 25°C inkubiert. In den in Teil I der Ergebnisse beschriebenen Experimenten wurde die ribosomale RNS-Synthese durch Vorinkubation der konzentrierten Zellsuspension (1 Std) in 5µg/ml 5-Fluorouridin (Calbiochem) gehemmt (Levis and Penman, 1977).

Die Langzeitmarkierung der RNS (s.V, 4) erfolgte durch Inkubation einer frisch angesetzten Kultur im obengenannten Mangelmedium und 3µCi/ml (5,6-^{3}H)-Uridin.

Zur Durchführung der Hitzeschockexperimente (IV,1 und V,3) wurden Zellen aus einer Kultur zur einen Hälfte wie oben beschrieben pulsmarkiert, die andere Hälfte wurde nach 15min bei 25°C in ein 37°C-Wasserbad überführt und bei Erreichen einer Temperatur von 35°C pulsmarkiert. Alle Kul-

turen wurden nach der Pulsmarkierung in Trockeneis/Äthanol schnell auf 0°-4°C abgekühlt und direkt weiterverarbeitet.

2. Präparation der Kerne und des hnRNP-Extraktes

Geerntete Zellen wurden resuspendiert in Lyse-Puffer (10mM Tris-Cl, pH 8,0 (0°C), 10mM NaCl, 3mM $MgCl_2$, 10% Sucrose, 4mM Dithioerythrit, 0,2% Triton X-100) und bei einer Zelldichte von $1x10^8$ Zellen/ml in einem Glashomogenisator (T-Stempel) 15mal homogenisiert in Gegenwart von 0,5mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Serva). Nach der Zentrifugation (10 min, 3000g) wurden die Kerne von cytoplasmatischen (ribosomalen, s.I, 1) Verunreinigungen befreit durch Inkubation in TEN-Puffer (10mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,1M NaCl, 1,5mM EDTA; viermal 15min, $5x10^7$ Kerne/ml). Diese Prozedur ist eine Modifikation der Methode von Biessmann et al. (1976).

Die gereinigten Kerne wurden in Gegenwart von 1mM PMSF in TMN-Puffer (10mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,1M NaCl, 1,5mM $MgCl_2$) bei einer Dichte von $1x10^9$ Kernen/ml einer Ultraschallbehandlung unterworfen (Branson-Sonifier, microtip, Stufe 3, sechsmal 10sec mit 50sec Pausen). Der Überstand der nachfolgenden 10,000g-Zentrifugation (10min) ist der hnRNP-Extrakt, das Sediment die "unlösliche Kernfraktion". Alle Schritte wurden bei 0°C durchgeführt.

Aliquots des hnRNP-Extraktes (üblicherweise 1ml) wurden auf lineare 10-45%ige Sucrosegradienten (in TMN-Puffer) aufgetragen und zentrifugiert (SW40 Rotor, 20.000UpM, 14Std, 0°C). 0,6ml Fraktionen wurden gesammelt (ISCO-Gradienten-Fraktionator) und Aliquots of Trichloressigsäure-fällbare

^{3}H-RNS getestet. Abweichungen von diesen Standardbedingungen sind in den entsprechenden Fällen in der Abbildung beschrieben. Die S-Werte wurden mit Hilfe eines Fortran-Programmes (von Rudolf Burberg) rechnerisch ermittelt und mit Markern (ribosomale Untereinheiten) verglichen.

3. Gelelektrophorese und Western Blot

a) SDS-Polyacrylamidgele

Zur Analyse in SDS-Polyacrylamidgelen wurden Fraktionen mit hohem Proteingehalt (z.B. Kernproteine, hnRNP-Extrakt) direkt in SDS-Probenpuffer (dreifach konzentriert: 60mM Tris-Cl, pH 6,8, 3% SDS, 5% ß-Merkaptoäthanol, 10% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau) 3min gekocht und auf das Sammelgel aufgetragen. Die Proteine der Sucrosegradienten-Fraktionen wurden vorher dialysiert und lyophilisiert. Die Trenngele waren entweder 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgele oder 10-17%ige Gradientengele (Laemmli, 1970).

b) Probenvorbereitung für die isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung wurden gereinigte Kerne bzw. Kernproteine ausgiebig in der Gegenwart von 1mM PMSF beschallt (s.o.) und durch Zugabe von festem ultrapurem Harnstoff (Schwarz-Mann) auf 8M Harnstoff eingestellt. Triton X-100 bzw. Nonidet P40 (NP40; Endkonzentration 2%) wurde nur bei der Analyse auf zweidimensionalen Gelen verwendet, weil diese Detergentien beim direkten Blot von Fokussierungsgelen das Binden der Proteine auf Nitrocellulose ver-

hindern (s. II,1). Ampholine (Pharmacia oder Serva) des pH-Bereiches 3-10 wurde zu 2% zugesetzt. Gesamtkernproteine sind unter diesen Bedingungen relativ gut löslich.

c) Äquilibrierte Fokussierung in Röhrchengelen

Zur quantitativen Bestimmung der Antigene (s. III, 2b) wurden Gesamtkernproteine direkt auf vertikale Röhrchengele (11 cm lang, 3 mm Durchmesser) aufgetragen. Für die äquilibrierte Fokussierung nach O´Farrell (1975) wurden die Röhrchengele (Ampholine: 0,3% pH 2-11, 1% pH 5-7, 0,7% pH 7-9) nach der Vorfokussierung (30min, 200V; 30min, 300V; 60min, 400V) auf der basischen Seite mit der Probe beladen, mit Puffer (8M Harnstoff, 5% NP40, 1% Ampholine pH3-10) überschichtet und fokussiert (16 Std. 400V, 1 Std. 600V, 1 Std. 800 V).

d) NEPHGE-Fokussierung in Röhrchengelen

NEPHGE-Gele (Peters and Comings, 1981) enthielten 2% Ampholine 3-10, wurden auf der sauren Seite aufgetragen und genau 11 Std. bei 400 V fokussiert.

Die Gele wurden mit Hilfe von Preßluft aus den Röhrchen getrieben, in SDS-Probenpuffer (s.o.) aufgenommen (ca. 15-30min) und mit Hilfe von Agarose (0,5% Agarose in 10mM Tris-Cl, pH 6,8, 0,2% SDS; ca. 75°C) auf vorbereiteten SDS-Polyacrylamidgelen fixiert.

e) Flachfokussierungsgele

Horizontale Flachfokussierungsgele (5% Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 8M Harnstoff, 0,1% Ammoniumpersulfat, 0,1%

TEMED (N,N,N´,N´-tetramethyläthylendiamin, Serva), 1,2% Ampholine pH 2-11, 1,2 % pH 8-10, 0,6% pH 5-7) wurden nach der Vorfokussierung (s.o.) 1 cm von der sauren Seite entfernt, durch Auftragen der Probe auf ein feuchtes Whatman 3MM Filterpapier beladen und fokussiert (Bedingungen wie oben, aber unter konstanter Kühlung auf 4°C).

f) Western Blot

Der Western Blot (oder Protein Blot) wurde für SDS-Polyacrylamidgele wie beschrieben (Risau, 1980; Risau et al., 1981) durchgeführt. Zweidimensionale Gele wurden bidirektional (Bowen et al., 1980) geblottet, ebenso wie die Flachfokussierungsgele (Reinhardt and Malamud, 1982). Die nachfolgende Behandlung der Nitrozellulosestreifen erfolgte wie beschrieben (Risau et al., 1981). Die Proteinbestimmung wurde nach Read und Northcote (1981) durchgeführt.

4. In vivo Vernetzung von RNS und Protein

Kc-Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS in wenig PBS resuspendiert und im Eisbad unter Rühren in Petrischalen (Plastik oder Stahl) einer UV-Bestrahlung (254nm, 4000 $\mu W/cm^2$, 15min) ausgesetzt (Setyono and Greenberg, 1981). Aus diesen Zellen wurde in der beschriebenen Weise der hnRNP-Extrakt präpariert. Unvernetztes Protein wurde von der RNS durch Zugabe von 0,4M NaCl und 0,5% SDS abgelöst und von $polyA^+$-RNS durch oligo-dT-Zellulose(PL-Biochemicals)-Chromatographie abgetrennt. Gebundene Moleküle wurden durch Elutionspuffer (10mM Tris-Cl pH 7,4, 1mM EDTA, 7mM ß-Merkaptoäthanol) eluiert, das Eluat auf 0,5M Salz eingestellt und

erneut an oligo-dt-Zellulose gebunden und eluiert. Die Proteine der an oligo-dt-Zellulose gebundenen und ungebundenen Fraktion wurden mit Äthanol präzipitiert (Zugabe von 0,1M Natriumacetat und 2,5 Volumen Äthanol, 15 Std., -20°C), das Sediment in wenig Elutionspuffer aufgenommen und mit RNase A (30ug/ml, Sigma) und RNase T1 (70 U/ml, Sigma) 1Std. bei 30°C verdaut. Ein Aliquot des gebundenen RNase-verdauten Materials wurde erneut auf 0,5M NaCl eingestellt und über oligo-dt-Zellulose aufgetrennt. Gebundene polyA-Protein-Komplexe wurden eluiert und nach Alkoholfällung (s.o.) mit RNase T2 (100 U/ml, Sigma) verdaut.

II. Isolierung und Analyse von RNS und DNS

RNS wurde aus intakten Kc-Kernen und dem hnRNP-Extrakt wie beschrieben (Levis and Penman, 1977) isoliert. RNS aus Immunpräzipitaten, dem hnRNP-Extrakt und Sucrosegradienten-Fraktionen wurde nach Proteinase K-Verdau (2% SDS, 100µg/ml Proteinase K (Merck), 30min, 37°C) durch Phenolextraktion mit nachfolgender Alkoholfällung (Davis et al., 1980) gereinigt.

SnRNS wurde auf SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen wie beschrieben analysiert (Zieve and Penman, 1982). Die Denaturierung von RNS und Analyse in SDS-Sucrosegradienten erfolgte nach Pederson und Davis (1980). Diese Gradienten (15-30% Sucrose, 0,5% SDS, 10mM Tris.Cl pH 7,0, 0,1M NaCl, 10mM EDTA) wurden aber im SW41-Rotor zentrifugiert (7 Std. 3.000 UpM, 22°C).

Für die "Dot-Blot-Hybridisierung" nach der Methode von Thomas (1980) wurde die RNS durch Glyoxal denaturiert und

auf Nitrozelluloserundfilter pipettiert (Dot-Blot 5-20ul). Die Nitrocellulose wurde vorher in 20xSSC (1xSSC=0,15M NaCl, 0,015M Natriumcitrat) äquilibriert (ca. 20 Std.), mit Bleistift beschriftet und bei Raumtemperatur getrocknet. Auch nach dem Dot-Blot wurden die Filter bei Raumtemperatur und danach 2 Std. bei 80°C getrocknet. Nach dem Vorhybridisieren der Filter (ca. 5 Std., 37°C in 50 % deionisiertem Formamid, 0,1M Hepes pH 7,3, 0,1% SDS, 4xSSC, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll (Molekulargewicht 400.000), 0,1% Polyvinylpyrollidon (Molekulargewicht 400.000), 100µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNS) wurde mit der ^{32}P-markierten Plasmid-DNS (wird direkt vor Verwendung durch Kochen denaturiert) hybridisiert (36Std., 37°C, gleicher Puffer wie bei der Vorhybridisierung). Ungebundene Radioaktivität wurde durch Waschen der Filter in 2xSSC, 0,1% SDS (viermal 5min bei Raumtemperatur) und in 0,1xSSC, 0,1% SDS (zweimal 15min bei 50°C)entfernt. Anschließend erfolgte die Trocknung und Autoradiographie der Filter.

DNS aus dem hnRNP-Extrakt wurde nach Proteinase-K-Verdau (s.o.) mit Alkohol gefällt und nach RNase A-Verdau (10ug/ml) auf 8%igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

Die Bakterien, die die rekombinanten Plasmide enthalten, wurden im P2-Sicherheitslabor kultiviert und aufgearbeitet nach den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren". Plasmid-DNS wurde wie beschrieben (Davis et al., 1980) isoliert. Der Verdau mit Restriktionsenzymen erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Methoden. Die "Nicktranslation" wurde nach Standardmethoden (s. z.B. Rigby et al., 1977) durchgeführt.

III. Immunologische Methoden

1. Allgemeine Methoden

Ausführlich beschrieben worden sind die Methoden der Zellkultur der Hybridzellinien, die die monoklonalen Antikörper sezernieren (Saumweber et al., 1980), die Isolierung und Jodierung von RAMfab-Antikörpern (Risau et al., 1981), die Methoden der indirekten und direkten Immunfluoreszenz und Quantifizierung (Saumweber, 1980; Risau et al., 1983) und die IgG-Bestimmung (Frasch, 1981).

Eine detaillierte Darstellung der Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Aszites-Flüssigkeit ist demnächst fertig (P. Symmons, persönliche Mitteilung). Die Isolierung von RAMfc-Antikörpern erfolgte aus dem Serum von Kaninchen, die mit fc-Fragmenten von Maus-IgG immunisiert waren nach der für RAMfab-Antikörper beschriebenen Methode. Anstelle der Maus-fab-Sepharose wurde Protein A-Sepharose (Pharmacia) verwendet. Im Doppeldiffusionstest (Ouchterlony and Nilsson, 1978) reagierte im Serum vorhandener und gereinigter Antikörper hauptsächlich mit fc-Fragmenten von Maus-IgG. Antikörper wurden kovalent an Cyanbromid-aktivierte Sepharose gekoppelt nach der Methode von March et al. (1974) bzw. (besser) wie im Pharmacia-Heft (Affinity Chromatography: Principles and Methods) beschrieben.

2. RIA und Reverse RIA

Der Antigengehalt der verschiedenen Fraktionen wurde durch einen Radioimmuntest (solid-phase Radioimmunoassay,

RIA) bestimmt. Microtiterplatten (Flow) wurden dazu mit 100µl Proteinlösung (100µg/ml bzw. 1/10 in PBS verdünnte Sucrosegradienten-Fraktionen) inkubiert (60min, 0°C). Nach der Blockierung der freien Proteinbindungskapazität durch Inkubation mit 0,1%BSA in PBS (60min, 0°C) wurde monoklonaler Antikörper in einer Konzentration von 1µg IgG/ml in 1:3 durch PBS verdünntem Zellkulturmedium eingesetzt (150µl, 15 Std., 0°C). Gebundener Antikörper wurde nach Inkubation (20 Std., 0°C) mit ^{125}J-RAMfab-Antikörper (20 mCi/mg, 10^5cpm in 150µl 0,1% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS pro Loch) und nachfolgendem Waschen, Trocknen und Auszählen im Gammazähler bestimmt. Zur Ermittlung des Hintergrundes wurde 1:3 in PBS verdünntes Zellkulturmedium anstelle des monoklonalen Antikörpers verwendet. In allen Fällen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Der Prozentsatz Antigen im hnRNP-Extrakt verglichen mit der unlöslichen Kernfraktion wurde im RIA ermittelt. Dazu wurden beide Fraktionen auf 100µg/ml Protein eingestellt und aus dieser Lösung eine Verdünnungsreihe hergestellt. Verglichen wurden die Werte der Verdünnung - und zwar der gleichen Verdünnung des Extraktes und der unlöslichen Fraktion -, in denen eine lineare Antwort zwischen der Menge Antigen und cpm ^{125}J-RAMfab gebunden gefunden wurde (d.h. Sättigung wurde vermieden).

Im Reverse RIA wurde gereinigter monoklonaler Antikörper in Mikrotiterplatten inkubiert (15µg IgG pro Vertiefung 2Std., 0°C). Freie Proteinbindungskapazität wurde wiederum durch Inkubation in 0,1% BSA (100% rein, Behring) in TMN-Puffer (sterilisierte Lösung) abgesättigt (2Std., 0°C). Danach wurden 150µl unverdünnte Sucrosegradienten-Fraktionen

inkubiert (15Std., 0°C) und nach zweimaligem Waschen mit TMN-Puffer (unter Zusatz von 0,1% Triton X-100, sterilisierte Lösung) getrocknet und gebundene pulsmarkierte ^{3}H-RNS ausgezählt. Kontrollwerte (Maus-IgG anstelle monoklonalen Antikörpers) und Meßwerte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

3. Immunpräzipitation

An dieser Stelle soll nur die Standardprozedur beschrieben werden, weil viele Einzelheiten schon im Ergebnisteil V erläutert worden sind:

RAMfc-Sepharose bzw. Protein A-Sepharose (Pharmacia) wurden in PBS äquilibriert, mit 0,2M Citratpuffer (pH3,0) danach mit 0,5M Tris.Cl pH 11,0 gewaschen, neutralisiert, mit 0,5M NaCl gewaschen und in TMN (pH 8,0 bei 10°C) äquilibriert (0,5ml gepacktes Gel/ml). Ein Aliquot wurde mit Antikörper 90min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert (10sec, 3000UpM, Hb4-Rotor), einmal mit TMN-Puffer (sterilisiert) gewaschen und danach mit Antigen (hnRNP-Extrakt, Sucrosegradienten-Fraktionen etc.) 1-4Std. bei 4°C inkubiert (unter Schütteln).
Diese Suspension wurde mit 1ml 45%iger Sucrose in TMN-Puffer unterschichtet, zentrifugiert (10sec, 5000 UpM, Hb4-Rotor) und die Sepharose noch zweimal gewaschen (TMN-Puffer mit oder ohne Zusatz von 0,1% Triton und 0,1-0,5M NaCl), wobei sie in Eppendorf-Röhrchen (1ml) überführt wurde. Zur Analyse der Proteine wurde die Sepharose in SDS-Probenpuffer gekocht, RNS wurde, wie beschrieben (s.Teil II Methoden), isoliert.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Methode zur Isolierung von hnRNS-Protein-Komplexen aus Drosophila Zellkulturzellen wurde entwickelt. Diese Methode erlaubt im Gegensatz zu bisher publizierten Methoden die Isolierung von Komplexen, die nahezu intakte Prämessenger-RNS in hochmolekularen Proteinpartikeln enthalten.

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper und neuer immunologischer Nachweisverfahren (Reverse RIA) konnte gezeigt werden, daß Antigene, die auf polytänen Chromosomen in transkriptionsaktiven Bereichen vorkommen, mit hnRNS assoziiert sind. Nach Identifizierung der Verpackungsproteine der hnRNS und Quantifizierung der Antigenmenge zeigte sich, daß die Antigene nicht mit den Verpackungsproteinen identisch sind, sondern nur ein- bis fünfmal pro Transkript vorkommen und wahrscheinlich am Processing beteiligt sind.

Eine Heterogenität von hnRNP-Komplexen konnte durch die Analyse der Zusammensetzung dieser Komplexe und die unterschiedlichen Verhältnisse der Antigene zueinander in transkriptionsaktiven Stellen auf polytänen Chromosomen nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser Heterogenität für das Processing wurde diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

Abelson, J. (1979). RNA Processing and the intervening sequence problem. Ann. Rev.Biochem. 48, 1035-1069

Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S. and Evans, R.M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature 298, 240-244

Anderson, K.V. and Lengyel, J.A. (1980). Changing rates of histone mRNA synthesis and turnover in Drosophila embryos. Cell 21, 717-727

Akusjärvi, G. and Persson, H. (1981). Controls of RNA splicing and termination in the major late adenovirus transcription unit. Nature 292, 420-426

Ashburner, M. (1972) in "Results and Problems in Cell Differentiation 4 (Beermann, W., ed.) 101-151 (Springer, Berlin)

Ashburner, M. (1972). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila. VI. Induction by ecdysone in salivary glands of D.melanogaster cultured in vitro. Chromosoma 38, 255-281

Ashburner, M. and Bonner, J.J. (1979). The induction of gene activity in Drosophila by heat shock. Cell 17, 241-254

Beermann, W. (1952). Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans. Chromosoma 5, 139-198

Berezney, R. (1979). Dynamic properties of the nuclear matrix. In: The cell nucleus (Busch, H. ed.) Vol.VII, Part D, pp. 413-456 (Academic Press, New York)

Berger, S.L. and Birkenmeier, C.S. (1979). Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complxes: Isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes. Biochemistry 18, 5143-5149

Beyer, A.L., Christensen, M.E., Walker, B.W. and LeStourgeon, W.M. (1977). Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles. Cell 11, 127-138

Beyer, A.L., Miller, O.L.,Jr. and McKnight, S.L. (1980). Ribonucleoprotein structure in nascent hnRNA is nonrandom and sequence-dependent. Cell 20, 75-84.

Beyer, A.L., Bouton, A.H. and Miller, O.L.,Jr. (1981). Correlation of hnRNP structure and nascent transcript cleavage. Cell 26, 155-165

Biessmann, H., Gjerset, R.A., Levy W., B. and McCarthy, B.J. (1976). Fidelity of chromatin transcripion in vitro. Biochemistry 15, 4356-4363

Blobel, G. and Potter, V.R. (1966). Relation of ribonuclease and ribonuclease inhibitor to the isolation of polysomes from rat liver. Proc.Natl.Acad.Sci. 55, 1283-1288

Bonner, J.J. and Pardue, M.L. (1977). Polytene chromosome puffing and in situ hybridization measure different aspects of RNA metabolism. Cell 12, 227-234

Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U.K. and Weintraub, H. (1980). The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. Nucleic Acids Res. 8, 1-20

Brawerman, G. (1981). The role of the poly(A) sequence in mammalian messenger RNA. Crit. Rev. Biochem. 10, 11-38

Brown, D.D. (1981). Gene expression in eucaryotes. Science 211, 667-674

Busch, H., Reddy, R., Rothblum, L. and Choi, Y.C. (1982). Ann. Rev. Biochem. 51, 617-653

Calvet, J.P. and Pederson, T. (1981). Base-pairing interactions between small nuclear RNAs and nuclear RNA precursors as revealed by Psoralen cross-linking in vivo. Cell 26, 363-370

Cech, T.R., Zaug, A.J., Grabowski, P.J. (1981). In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. Cell 27, 487-496

Chambon, P. (1981). Split genes. Scientific American 244, 48-59

Christensen, M.E., LeStourgeon, W.M., Jamrich, M., Howard, G.L., Serunian, L.A., Silver, L.M. and Elgin, S.C.R. (1981). Distribution studies on polytene chromosomes using antibodies directed against hnRNP. J.Cell.Biol. 90, 18-24

Chu, G. and Sharp, P.A. (1981). A gene chimaera of SV40 and mouse ß-globin is transcribed and properly spliced. Nature 289, 378-382

Claviez, M., Pagh, K., Maruta, H., Baltes, W., Fisher, P. and Gerisch, G. (1982). Electron microscopic mapping of monoclonal antibodies on the tail region of Dictyostelium myosin. The EMBO Journal 1, 1017-1022

Crabtree, G.R. and Kant, J.A. (1982). Organization of the rat γ fibrinogen gene: Alternative mRNA splice patterns produce the γ A and γ B (γ′) chains of fibrinogen. Cell 31, 159-166

Craig, E.A., McCarthy, B.J. and Wadsworth, S.C. (1979). Sequence organization of two recombinant plasmids containing genes for the major heat shock-induced protein of Drosophila melanogaster. Cell 16, 575-588

Crick, F. (1979). Split genes and RNA splicing. Science 204, 264-271

Darnell, J.E.,Jr. (1982). Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. Nature 297, 365-371

Davidson, E.H., Hough-Evans, B.R. and Britten, R.J. (1982). Molecular biology of the sea urchin embryo. Science 217, 17-26

Davis, R.W., Botstein, D. and Roth, J.R. (eds.) (1980). Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor, New York

Echalier, G. and Ohanessian, A. (1970). In vitro culture of Drosophila melanogaster embryonic cells. In Vitro 6, 162-172

Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, C.R. (1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. Immunochemistry 15, 429-436

Falkenthal, S., Graham, M.L., Korn, E.L. and Lengyel, J.A. (1982): Transcription, processing and turnover of RNA from the Drosophila mobile genetic element copia. Dev. Biol. 92, 294-305

Felber, B.K., Orkin, S.H. and Hamer, D.H. (1982). Abnormal RNA splicing causes one form of α thalassemia. Cell 29, 895-902

Findly, R.C. and Pederson, T. (1981). Regulated transcription of the genes for actin and heat-shock proteins in cultured Drosophila cells. J. Cell. Biol. 88, 323-328

Frasch, M. (1981). Monoklonale Antikörper gegen Drosophila-Proteine aus Kernfraktionen: Untersuchungen zur Antikörperspezifität und Antigenverteilung. Diplomarbeit Universität Tübingen

Fukumaki, Y., Ghosh, P.K., Benz, E.J. jr., Reddy, V.B., Lebowitz, P., Forget, B.G. and Weissman, S.M. (1982). Abnormally spliced messenger RNA in erythroid cells from patients with β^+ thalassemia and monkey cells expressing a clonal β^+ thalassemic gene. Cell 28, 585-593

Fyrberg, E.A., Boud, B.J., Hershey, N.D., Mixter, K.S. and Davidson, N. (1981). The actin genes of Drosophila: Protein coding regions are highly conserved but intron positions are not. Cell 24, 107-116

Gallinaro-Matringe H., Stevenin, J. and Jacob, M. (1975). Salt dissociation of nuclear particles containing DNA-like RNA. Distribution of posphorylated and non-phosphorylated species. Biochemistry 14, 2547-2554

Gilbert, W. (1978). Why genes in pieces? Nature 271, 501

Gruss, P., Lai, C., Dhar, R. and Khoury, G. (1979). Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4317-4321

Hamer, D.H. and Leder, P. (1979). Splicing and the formation of stable RNA. Cell 18, 1299-1302

Herman, R., Weymonth, L. and Penman, S. (1978). Heterogeneous nuclear RNA-protein fibers in chromatin-depleted nuclei. J. Cell Biol. 78, 663-674

Holmgren, R, Corces, V., Marimoto, R., Blackman, R and Meselson, M. (1981). Sequence homologies in the 5' regions of four Drosophila heat-shock genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 3775-3778

Hügle, B. (1981). Untersuchung von kernspezifischen Nicht-histonproteinen in Mammalia-Zellen mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Diplomarbeit Universität Heidelberg

Hügle, B., Guldner, H., Bautz, F.A. and Alonso, A. (1982). Cross-reaction of hnRNP-proteins of HeLa Cells with nuclear proteins of Drosophila melanogaster demonstrated by a monoclonal antibody. Exp. Cell Res. 142, 119-126

Imaizumi-Scherrer, M., Maundrell, K., Civelli, O. and Scherrer, K. (1982). Transcriptional and post-transcriptional regulation in duck erythroblasts. Dev. Biol. 93, 126-138

Ireland, L., Szyszko, J. and Krause, M. (1982). Small nuclear RNAs from Drosophila Kc-H cells; characterization and comparison with mammalian RNAs. Mol. Biol. Rep. 8, 97-101

Jones, R.E., Okamura, C.S. and Martin, T.E. (1980). Immunofluorescent localization of the proteins of nuclear ribonucleoprotein complexes. J.Cell.Biol. 86, 235-243

Kabisch, R. (1982). Differentielle Verteilung von Nichthistonproteinen auf polytänen Chromosomen von Drosophila melanogaster. Dissertation Universität Heidelberg

Karn, J., Vidali, G., Boffa, L.C. and Allfrey, V.G. (1977). Characterization of the non-histone nuclear proteins associated with rapidly labeled heterogeneous nuclear RNA. J.Biol.Chem. 252, 7307-7322

Kaufmann, S.H., Coffey, D.S. and Shaper, J.H. (1981). Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope, and pore complex lamina. Exp. Cell Res. 132, 105-123

Khoury, G., Gruss, P., Dhar, R. and Lai, C. (1979). Processing and expression of early SV40 mRNA: a role for RNA conformation in splicing. Cell 18, 85-92

Kinniburgh, A.J. and Martin, T.E. (1976). Detection of mRNA sequences in nuclear 30S ribonucleoprotein subcomplexes. Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2725-2729

Knowler, J.T. and Wilks, A.F. (1980). Ribonucleoprotein particles and the maturation of eukaryote mRNA. Trends Biochem.Sci. 5, 268-271

Kobus, S. (1980). Charakterisierung von eukaryotischen RNP-Partikeln. Diplomarbeit Universität Bochum

Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497

Krämer, A., Haars, R., Kabisch, R., Will, H., Bautz, F.A. and Bautz, E.K.F. (1980). Monoclonal antibody directed against RNA polymerase II of Drosophila melanogaster. Molec.Gen.Genet. 180, 193-199

Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. (1982): Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. Cell 31, 147-257

Kumar, A. and Pederson, T. (1975). Comparison of proteins bound to heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA in HeLa cells. J.Mol.Biol. 96, 353-365

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

Langone, J.J. (1982). Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. J. Immunol. Methods 55, 277-296

Lazowska, J., Jacq, C. and Slonimski, P.P. (1980). Sequence of introns and flanking exons in wildtype and box3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. Cell 22, 333-348

Lengyel, J. and Penman, S. (1975). hnRNA size and processing as related to different DNA content in two dipterans: Drosophila and Aedes. Cell 5, 281-290

Lerner, M.R. and Steitz, J.A. (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythrematosus. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 5495-5499

Lerner, M.R. and Steitz, J.A. (1981). Snurps and Scyrps. Cell 25, 298-300

Lerner, M., Boyle, J., Mount, S., Wolin, S., and Steitz, J.A. (1980). Are snRNPs involved in splicing? Nature 283 220-224

Levis, R. and Penman, S. (1977). The metabolism of poly(A)$^+$ and Poly(A)$^-$ hnRNA in cultured Drosophila cells studied with a rapid uridine pulse-chase. Cell 11, 105-113

Lukanidin, E.M., Zalmanzon, E.S., Komaromi, L., Samarina, O.P. and Georgiev, G.P. (1972a). Structure and function of informofers. Nature New Biol. 238, 193-197

Lukanidin, E.M., Olsnes, S. and Pihl, A. (1972b). Antigenic difference between informofers an protein bound to polyribosomal mRNA from rat liver. Nature New Biol. 240, 90-92

Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W. and Tonegawa, S. (1981). The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. Cell 24, 353-365

March, S.C., Parikh, I. and Cuatrecasas, P. (1974). A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal. Biochem. 60, 149-152

Martin, T., Billings, P., Levey, A., Ozarslan, S., Quinlan, T., Swift, H. and Urbas, L. (1973). Some properties of RNA: Protein complexes from the nucleus of eucaryotic cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 921-932

Martin, T., Jones, R. and Billings, P. (1979). HnRNP core proteins: Synthesis, turnover an intracellular distribution. Mol. Biol. Rep. 5, 37-42

Martin, T.E. and Okamura, C.S. (1981). HnRNP protein distribution in various differentiated vertebrate cells. In International Cell Biology 1980-1981, H.G. Schweiger, ed. (Springer Verlag, Berlin), pp. 77-84

Maquat, L.E., Kinniburgh, A.J., Rachmilewitz, E.A. and Ross, J. (1981). Unstable ß-globin mRNA in mRNA-deficient ß° thalassemia. Cell 27, 543-553

Miller, O.L.,Jr. and Hamkalo, B.A. (1972). Visualization of RNA synthesis on chromosomes. Int.Rev.Cytol. 33, 1-25

Morrissey, J.H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal. Biochem. 117,, 307-310

Mount, S. and Steitz, J.A. (1981). Sequence of U1 RNA from Drosophila melanogaster: implications for U1 secondary structure and possible involvement in splicing. Nucl. Acids Res. 9, 6351-6368

Nevins, J.R. (1982). Adenovirus gene expression: Control at multiple steps of mRNA biogenesis. Cell 28, 1-2

Nevins, J.R. and Darnell, J.E. jr. (1978). Steps in the processing of adenovirus 2 mRNA: Poly(A)+ nuclear sequences are conserved and poly(A) addition precedes splicing. Cell 15, 1477-1493

Nevins, J.R. and Wilson, M.C. (1981). Regulation of adenovirus-2 gene expression at the level of transcriptional termination and RNA processing. Nature 290, 113-118

Nordheim, A., Pardue, M.L., Lafer, E.M., Möller, A., Stollar, B.D. and Rich, A. (1981). Antibodies to left-handed Z-DNA bind to interband regions of Drosophila polytene chromosomes. Nature 294, 417-422

Nordheim, A., Tesser, P., Azorin, F., Kwon, Y.H., Möller, A. and Rich, A. (1982). Isolation of Drosophila proteins that bind selectively to left-handed Z-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7729-7733

O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021

O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. and O'Farrell, P.H. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell 12, 1133-1142

Ouchterlony, Ö. and Nilsson, L.A. (1978). Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. In: Handbook of Experimenal Immunology (Weir, d.M. ed.) Vol. 1, Chapter 19, pp. 19.1-19.44. (Oxford: Blackwell Scientific Publications)

Pederson, T. (1974). Proteins associated with heterogeneous nuclear RNA in eucaroytic cells. J.mol.Biol. 83, 163-183

Pederson, T. and Davis, N.G. (1980). Messenger RNA processing and nuclear structure: Isolation of nuclear ribonucleoprotein particles containing ß-globin messenger RNA precursors. J.Cell Biol. 87, 47-54

Perry, R.P. and Kelley, D.E. (1973). Messenger RNA turnover in mouse L cells. J. Mol. Biol. 70, 681-696

Peters, K.E. and Comings, D.E. (1980). Two-dimensional gel electrophoresis of rat liver nuclear washes, nuclear matrix and hnRNA proteins. J.Cell Biol. 86, 135-155

Peterson, J.L. and McConkey, E.H. (1976). Non-histone chromosomal proteins from HeLa cells: A survey by high-resolution, two-dimensional electrophoresis. J. Biol. Chem. 251, 548-554

Read, S.M. and Northcote, D.H. (1981). Minimization of variation in the response to different protens of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein. Anal. Biochem. 116, 53-64

Reinhardt, M.P. and Malamud, D. (1982). Protein transfer from isoelectric focusing gels: The native blot. Anal. Biochem. 123, 229-235

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251

Riley, D.E. (1980). Deoxyribonuclease I generates single-stranded gaps in chromatin deoxyribonucleic acid. Biochemistry 19, 2977-2992

Risau, W. (1980). Verfahren zur Charakterisierung von Antigenen in einer komplexen Proteinmischung. Diplomarbeit Universität Tübingen

Risau, W., Saumweber, H. and Symmons, P. (1981). Monoclonal antibodies against a nuclear membrane protein of Drosophila. Exp.Cell Res. 133, 47-54

Risau, W., Saumweber, H., Symmons, P., Burberg, R. and Bonhoeffer, F. (1983). Heterogeneity of ribonucleoprotein complexes containing newly transcribed RNA in Drosophila melanogaster; zur Veröffentlichung eingereicht

Rogers, J. and Wall, R. (1980). A mechanism for RNA splicing. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 1877-1879

Salditt-Georgieff, M., Harpold, M.M., Wilson, M.C. and Darnell, J.E., jr. (1981). Large heterogeneous nuclear ribonucleic acid has three times as many 5´caps as polyadenylic acid segments, and most caps do not enter polyribosomes. Mol. Cell. Biol. 1, 179-187

Salditt-Georgieff, M. and Darnell, J.E., jr. (1982). Further evidence that the majority of primary nuclear RNA transcripts in mammalian cells do not contribute to mRNA. Mol. Cell. Biol. 2, 701-707

Samarina, O.P., Lukanidin, E.M., Molnar, J. and Georgiev, G.P. (1968). Structural organization of nuclear complexes containing DNA-like RNA. J.mol.Biol. 33, 251-263

Saumweber, H. (1980). Monoklonale Antikörper gegen Kernproteine von Drosophila melanogaster. Dissertation Universität Tübingen

Saumweber, H., Symmons, P., Kabisch, R., Will, H. and Bonhoeffer, F. (1980). Monoclonal antibodies against chromosomal proteins of Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 80, 253-275

Schneider, C., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Asser, U. and Greaves, M.F. (1982). A one-step purificaton of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. J. Biol. Chem. 257, 10766-10769

Setyono, B. and Greenberg, J.R. (1981). Proteins associated with poly(A) and other regions of mRNA and hnRNA molecules as investigated by crosslinking. Cell 24, 775-783

Sharp, P.A. (1981). Speculations on RNA splicing. Cell 23, 643-646

Silver, L.M. and Elgin, S.C.R. (1978). Immunological analysis of protein distributions in Drosophila polytene chromosomes. In: The Cell Nucleus, Vol. V (Busch, H. ed.) 215-262, New York, Academic Press

Sommerville, J., Crichton, C. and Malcolm, D. (1978). Immunofluorescent localization of transcriptional activity on lampbrush chromosomes. Chromosoma (Berl.) 66, 99-114

Spector, D.L., Schrier, W.H. and Busch, H. (1982). Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. J. Cell. Biol. 95, 468a

Szabó, G., Marczinovits, J., Komáromy, L., Bajszar, G. and Molnár, J. (1981). HnRNP particles from Drosophila melanogaster cells. Molec. Biol. Rep. 7, 221-225

Therwath, A. and Scherrer, K. (1978). Post-transcriptional suppression of globin gene expression in cells transformed by avian erythroblastosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 3776-3780

Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205

Thomas, P.S., Shepherd, J.H., Mulvihill, E.R. and Palmiter, R.D. (1981). Isolation of a nuclear ribonucleoprotein fraction from chick oviduct containing ovalbumin messenger RNA sequences. J.Mol.Biol. 150, 143-166

Treisman, R., Proudfoot, N.J., Shander, M. and Maniatis, T. (1982). A single-base change at a splice site in a β^0-thalassemic gene causes abnormal RNA splicing. Cell 29, 903-911

Van Eekelen, C.A.G. and van Venrooij, W.J. (1981). HnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix. J. Cell. Biol. 88, 554-563

Van Venrooij, W.J. and Janssen, D.B. (1978). HnRNP particles. Molec.Biol.Rep. 4, 3-8

Vogeli, G., Avvedimento, E.V., Sullivan, M., Maizel, J.V.,jr., Lozano, G., Adams, S.L., Pastan, J. and de Crombrugghe, B. (1980). Isolation and characterization of genomic DNA coding for 2 type I collagen. Nucl. Acids Res. 8, 1823-1837

Wall, R. (1980). Immunoglobulin RNA processing. Trends Biochem. Sci. 5, 325-327

Walter, P. and Blobel, G. (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. Nature 299, 691-698

Weingärtner, B. and Keller, W. (1981). Transcription and processing of adenoviral RNA by extracts from HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 4092-4096

Wooley, J.C., Cone, R. and Chung, S. (1981). Isolation and characterization of nuclear ribonucleoprotein complexes from Drosophila melanogaster. Molec. Biol. Rep. 7, 5-13

Wooley, J.C., Cone, R.D., Tastof, D. and Chung, S. (1982). Small nuclear ribonucleoprotein complexes of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci.79, 6762-6766

Yang, V.W., Lerner, M.R., Steitz, J.A. and Flint, S.J. (1981). A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 1371-1375

Zieve, G.W. (1981). Two groups of small stable RNAs. Cell 25, 296-297

Zieve, G. and Penman, S. (1981). Subnuclear particles containing a small nuclear RNA and heterogeneous nuclear RNA. J.mol.Biol. 145, 501-523

Ziff, E.B. (1980). Transcription and RNA processing by the DNA tumour viruses. Nature 287, 491-499

Zimmerman, J.L., Fouts, D.L., Levy, L.S. and Manning, J.E. (1982). Nonadenylated mRNA is present as polyadenylated RNA in nuclei of Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 3148-3152

Zulauf, E., Sanchez, F., Tobin, S.L., Rdest, U. and McCarthy, B.J. (1981). Developmental expression of a Drosphila actin gene encoding actin I. Nature 292, 556-558

Lebenslauf

Werner R i s a u

18.12.1953	geboren in Rheine/Westfalen Vater: Ewald Risau Mutter: Anna Risau, geb. Diesen
1960-1964	Volksschule Rheine
1964-1972	Gymnasium Dionysianum Rheine
1972-1973	Wehrdienst Bundeswehr
1973-1976	Studium der Chemie, Universität Münster
1976	Diplomvorexamen Chemie, Universität Münster
1976-1979	Studium der Biochemie, Universität Tübingen
1977	Diplomvorexamen Biochemie, Universität Tübingen
1979	mündliche Diplomhauptprüfung Biochemie, Universität Tübingen
seit 1979	Studium der Humanmedizin, Universität Tübingen
1979-1980	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für physikalische Biologie (Leiter: Dr. F. Bonhoeffer) in Tübingen
seit 1980	Doktorarbeit in derselben Arbeitsgruppe.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann	D. Mecke
E. Bayer	W. Müller-Warmuth
F. Bonhoeffer	E. Ninnemann
V. Braun	W. Schäfer
K. Grell	W. Seyffert
J. Guglielmi	F. Umland
P. Hausen	G. Weitzel
T. Kauffmann	U. Weser